

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	3
2	Summary	4
3	Einleitung	1
3.1	Problembeschreibung	1
3.2	Ziel der Arbeit	1
4	Literatur	2
4.1	Die Muskelphysiologie	2
4.2	Die Rotatorenmanschette und ihre Erkrankungen	4
4.3	Die Muskeldegeneration nach Sehnenruptur beim Menschen und beim Schaf	5
4.4	Operationsmethode nach Gavril Ilizarov als Grundidee	8
5	Material und Methoden	10
5.1	Aufbau der Studie	10
5.1.1.1	Ankauf und Auswahl der Tiere	10
5.1.1.2	Vorbereitung der Tiere	10
5.1.2	Tenotomie der Sehne des M. infraspinatus	11
5.1.2.1	Operationsvorbereitungen	11
5.1.2.2	Lagerung und Desinfektion	12
5.1.2.3	Operationsverlauf	12
5.1.2.4	Operationsnachsorge	13
5.1.3	Fixation des Spanners	13
5.1.3.1	Operationsvorbereitungen	13
5.1.3.2	Lagerung und Desinfektion	13
5.1.3.3	Operationsverlauf	13
5.1.3.4	Operationsnachsorge	14
5.1.4	Computertomographiekontrollen	15
5.1.5	Reattachment der Sehne	15
5.1.5.1	Operationsvorbereitungen	15
5.1.5.2	Lagerung und Desinfektion	15
5.1.5.3	Operationsverlauf	15
5.1.5.4	Stützverband	16
5.1.5.5	Computertomographie	16
5.1.5.6	Operationsnachsorge	16
5.1.6	Euthanasie und Sektion	16
5.1.7	Untersuchungsmethoden	17
5.1.7.1	Histologie	17
5.1.8	Statistische Auswertung	20

6	Resultate	21
6.1	Operationen und postoperative Phasen	21
6.2	Makroskopische Beurteilung zum Zeitpunkt der Euthanasie	22
6.3	Histomorphometrie	22
6.3.1	HE- Färbung	22
6.3.2	Antikörperfärbung	23
6.3.3	Ölrotfärbung	26
6.3.4	Faserdurchschnittsmessung	27
7	Diskussion	33
7.1	Versuchsmodell	33
7.2	Operationen und Verlauf	34
7.3	Probenaufbereitung, Färbungen und Auswertung	35
7.4	Histologie	36
7.4.1	Antikörperfärbung	36
7.4.1.1	Typ I	36
7.4.1.2	Typ II	37
7.4.1.3	Background	38
7.4.2	Ölrotfärbung	39
7.4.2.1	Fettanteil	39
7.4.2.2	Muskelanteil	40
7.4.2.3	Background	40
7.4.3	Faserdurchmesser	40
7.4.3.1	Typ I und Typ II Fasern	40
8	Schlussfolgerungen und Zukunftsperspektiven	42
9	Abbildungsverzeichnis	
10	Literaturverzeichnis	54
11	Danksagung	57
12	Lebenslauf	58

1 Zusammenfassung

Eine neue Operationsmethode zur Heilung oder Verbesserung einer chronischen Rotatorenmanschettenruptur beim Menschen wurde in dieser Studie an Schafen experimentell durchgeführt. Die Fragestellung lag vor allem darin, die bei chronischen Sehnenrissen auftretende fettige Degeneration des betroffenen Muskels reversibel zu machen. Für die Studie wurden 12 Schafe (6 männliche und 6 weibliche) im Alter von 2-3 Jahren operiert, wobei sich im Laufe der Studie 2 Gruppen heraus kristallisierten. Bei beiden Gruppen wurde im ersten Schritt den Tieren durch Durchtrennung der Sehne des M. infraspinatus eine chronische Ruptur vergleichbar zum Menschen hervorgerufen. Nach 12 Wochen bekamen die Schafe beider Gruppen einen speziell entwickelten Dehnapparat eingesetzt. Nach dieser Implantation wurde der Muskel täglich um 1mm gedehnt. Nach ca. 6 Wochen waren die Sehnen in der einen Gruppe wieder an dem Punkt angelangt, an dem man sie tenotomiert hatte. In der 2. Gruppe (4 Tiere) traten bis zu diesem Zeitpunkt Komplikationen (Infektionen) auf, und die Tiere mussten hier vorzeitig euthanasiert werden. Der letzte operative Schritt in der verbliebenen ersten Gruppe (8 Tiere) lag darin, die Sehne wieder so nah wie möglich an ihrem Insertionspunkt, mittels einer Schraube, zu fixieren. Die nächsten 6 Wochen verbrachten die Tiere in speziell für Schafe angefertigte Hängesysteme, die sie gut tolerierten. Sie bekamen einen Stützverband an das operierte Bein um im Stehen eine Entlastung der frisch refixierten Sehne zu gewährleisten. Diese Maßnahmen sind einer Ruhigstellung des Armes nach einer Operation beim Menschen zu vergleichen. Anschließend wurden die Tiere euthanasiert.

Anhand physiologischer, radiologischer, histologischer, histomorphometrischer und molekularbiologischer Untersuchungsmethoden wurden Veränderungen der Muskelfasertypen, Fettgehalte und Messungen der Durchmesser der Muskelfasern festgestellt.

Die histologischen Ergebnisse zeigten eine geringe Regeneration der Muskulatur nach kontinuierlicher Dehnung. Jedoch wurde eine Tendenz beobachtet, dass die fettige Degeneration nach Implantation zum Stillstand kam, bzw. die Veränderungen langsamer abliefen und sich vor allem Typ II Muskelfasern nach der Refixation teilweise wieder regenerierten.

2 Summary

In this experimental study with sheep a new surgical technique to treat chronic ruptures of the rotator muscles of the shoulder in humans was evaluated. The main focus was placed on fatty degeneration of muscles after rupture and whether this process would be reversible during subsequent therapy. 12 Swiss Alpine sheep (2-3 years of age) were chosen for the study, where the tendon of the infraspinatus muscle was cut at its insertion including a bone chip and allowed to retreat for 12 weeks to mimic chronic rupture. Thereafter, a specially designed tension device was implanted in the scapula, where the tendon was fixed at its distal insertion. Traction with 1mm/day was applied to the muscle until the end of the tendon had approximately reached its original insertion point. One group of animals was sacrificed at this point, whereas the other group underwent reattachment of the tendon to the proximal humerus and was followed for another 6 weeks until sacrifice. Retraction, resp. prolongation of the muscle was studied clinically using CT, and regeneration of muscle tissue histologically, histomorphometrically, and applying special immunohistological techniques. Focus was placed on changes of muscle fibres in types and diameter as well as area of fatty degeneration. Results showed that there was a tendency for muscle fibres type II to regenerate under continuous tension, and fatty degeneration could be halted.

3 Einleitung

3.1 Problembeschreibung

Sehnenrupturen der Rotatorenmanschetten der Schulter kommen beim Menschen häufig vor. Etwa ein Drittel der über 60 jährigen leiden an einem solchen akuten oder chronischen Geschehen. Die bisher eher schlechten Behandlungsergebnisse lassen sich nicht nur mit der meist verspätet gestellten Diagnose, sondern vor allem mit den damit verbundenen bisher irreversiblen Schäden der Muskulatur erklären. Bei Ruptur der Sehne kommt es vorerst zu einer sofortigen Muskelretraktion. Dadurch wird der Fiederungswinkel der Muskulatur vergrößert und die Fasern schließlich permanent verkürzt. Zwischen den Fasern entstehen durch die Winkelvergrößerung Zwischenräume, die der Körper mit Fett ausfüllt. Die Regenerationsfähigkeit nimmt signifikant mit der Zunahme der Muskelatrophie und der Verfettung ab und somit auch die Operationserfolge durch eine Reinsertion der Sehnen- Muskelverbindung [1, 2].

3.2 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war eine Möglichkeit zu finden, die bisher irreversiblen Schäden einer experimentell herbeigeführten Rotatorenmanschettenruptur im Schaf chirurgisch mit Erfolg zu behandeln. Nach einer experimentell hervorgerufenen chronischen Sehnenruptur kommt es auch beim Schaf zu den beschriebenen Veränderungen der Muskulatur. Die Arbeit basierte auf der Hypothese, dass mittels einer kontinuierlichen Muskeldehnung vor der Reparatur der Sehnen die Muskelveränderungen wieder rückgängig gemacht werden könnte. Für die kontinuierliche Dehnung wurde ein spezieller Dehnapparat entwickelt.

Die Muskeldegeneration und- regeneration sollten anhand physiologischer, radiologischer, histologischer und molekularbiologischer Untersuchungsmethoden dokumentiert werden.

Abgesehen von der Sehnenruptur versprach man sich Erkenntnisse zum Muskeldehnungs- und Hypertrophiepotential, die Einfluss auf verschiedene Bereiche der Chirurgie und Orthopädie (z.B. Gelenkprothesenimplantationen mit Extremitätenverlängerung, Umstellungsosteotomien) haben könnten. Auch im Hinblick auf die Behandlung von verkürzten Muskeln mit physiotherapeutischen Maßnahmen könnte es zu Erkenntnissen kommen, die zu einer Optimierung der vorhandenen Behandlungsmethoden führt.

4 Literatur

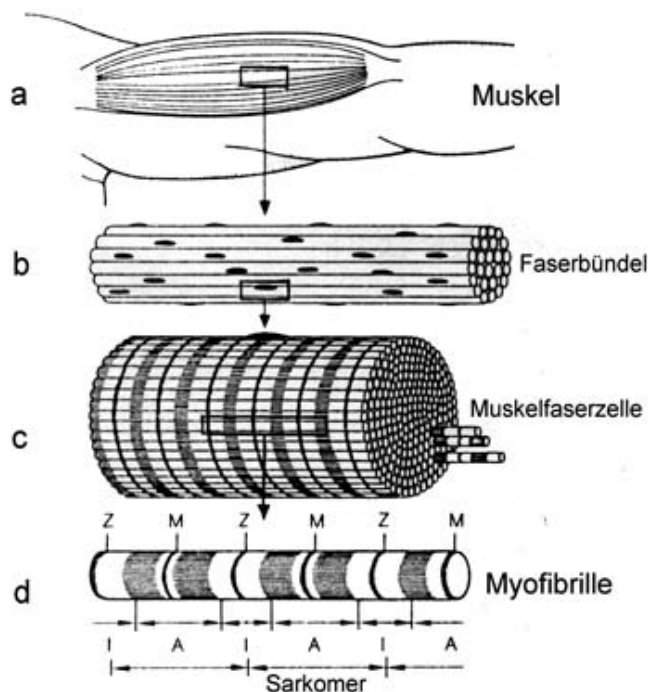
4.1 Die Muskelphysiologie

Muskelzellen können chemische Energie (ATP) in mechanische bzw. Wärmeenergie umwandeln. Je nach ihrer physiologischen Aufgabe können 2 verschiedene Arten von Muskelgeweben unterschieden werden:

- Glatte Muskulatur
- Quergestreifte Muskulatur

Quergestreiftes Muskelgewebe wird in Skelett- und Herzmuskulatur unterteilt, wobei im Folgenden nur auf die hier relevante Skelettmuskulatur eingegangen wird. Das Gewebe setzt sich aus parallel orientierten Skelettmuskelzellen zusammen, die stark vaskularisiert sind und von motorischen und sensiblen Nervenfasern innerviert werden. Bindegewebige Hüllen fassen Muskelzellen zu kleineren und größeren funktionellen Einheiten zusammen. Muskelfasern bestehen aus Myofibrillen und diese wiederum aus Aktin- und Myosinfilamenten, die durch regelmäßige Anordnung im Längsschnitt eine charakteristische Querstreifung zeigen.

Unter dem Mikroskop zeigen sich durch die unterschiedliche Lichtbrechung verschiedene Bereiche des Gewebes.



Als I-Streifen werden einfachbrechende, isotrope also helle Bereiche bezeichnet. A-Streifen sind doppelt brechende, anisotrope also dunkle Bereiche. Die dunkle Zwischenscheibe (Z-Streifen) unterteilt den I-Streifen. Der A-Streifen wiederum wird vom schmalen M-Streifen

unterteilt.

Die kleinste kontraktile Einheit des Muskels ist das Sarkomer, welches zwischen 2 Z-Streifen liegt. Bei Längenveränderungen einer größeren Anzahl von Sarkomeren, kommt es auch zu Längenveränderungen des gesamten Muskels.

Muskeln setzen sich aus verschiedenen Fasertypen zusammen. Hier wird nur auf die 3 wichtigsten eingegangen.

- Muskelfasern, die von leicht erregbaren kleinen α - Motoneuronen innerviert werden, bilden eine S-Einheit (Slow– **Typ I**). Diese entwickeln langsam geringe Kräfte, haben einen überwiegend aeroben Stoffwechsel und besitzen viel Myoglobin und sind deshalb rot. Die Fasern werden von jeweils 4-6 Kapillaren umgeben. Die Muskelfasern sind auf Haltefunktion spezialisiert und ermüden wenig.
- **Typ II B** Fasern werden von besonders großen, schwer erregbaren α - Motoneuronen innerviert. Sie werden auch als FF-Einheit (fast, fatigable) bezeichnet. Sie sind eher blass oder „weiß“ und entwickeln schnell starke Kräfte. Sie besitzen nur wenig Mitochondrien, dafür aber Enzyme zur anaeroben ATP- Synthese aus Glukose. Diese Fasern werden nur von 1-2 Kapillaren umgeben. Sie haben einen größeren Umfang und ermüden schnell.
- Die intermediären **Typ II A** Fasern werden als FR-Einheit (fast resistant to fatigue) bezeichnet. Sie werden von mittelgroßen und mittelmäßig erregbaren α - Motoneuronen innerviert. Diese auch roten Muskelfasern besitzen sowohl Enzymsysteme zur aeroben als auch die zur anaeroben ATP-Gewinnung aus Glukose. Diese schnellen, ausdauernden Fasern entwickeln zwar nicht die Kräfte als FF-Einheiten und sind auch nicht so ausdauernd als die S-Einheit, sie besitzen aber von beiden ein gutes Maß. Die Variation der Eigenschaften der FR- Einheiten sind enorm. Bei Training eines Muskels auf Ausdauer nimmt die anaerobe Kapazität der FR-Einheiten zu. Auch Fasertransformationen von Typ IIB in IIA und auch in Typ I sind beschrieben worden.

Die Größe und Erregbarkeit der α - Motoneurone legen den Fasertyp der von ihnen innervierten Muskeln fest. [3, 4]

Skelettmuskelfasern besitzen mehrere Kerne (Nukleotide), die randständig liegen. Jede Zelle ist mit Endomysium umgeben und sie haben Verbindungen zu den Nachbarzellen. Kleine so genannte Satelitenzellen liegen zwischen den Muskelzellen. Sie besitzen nur einen Kern und spielen eine regenerative Rolle [5].

In der Literatur wurden über die Jahre hinweg mehrere Nomenklaturen der Skelettmuskelfasertypen des Schafes klassifiziert [6-8]. Laut Peinado et al treten beim Schaf im M. longissimus thoracis und M. tibialis cranialis Muskelfasertypen I, IIA, IIB und IIC auf. Die Autoren zeigten, dass die Interpretation der Muskelfasern von der benutzten Methode abhängt. Mit der histochemischen ATP-ase Methode konnte man Typ I, Typ IIA, IIB und IIC unterscheiden, die sich auch im M. longissimus zu 2 verschiedenen Zeitpunkten im Abstand vom 30. zum 90. Tag nach der Geburt nicht veränderten [9]. In den Studien von White et al. und Moody et al. wird gezeigt, dass sich die Fasertypenzusammensetzung des M. quadriceps und M. longissimus nach der Geburt prozentual noch verändert [10, 11].

4.2 Die Rotatorenmanschette und ihre Erkrankungen

Vier Muskeln des Schultergürtels des Schultergelenks bilden mit der Gelenkkapsel im Wesentlichen die Rotatorenmanschette. Die Muskeln ziehen vom Schulterblatt Richtung Humerus.

Der M. supraspinatus (oberer Schulterblattgrätenmuskel) kommt von proximal und seitlich des Gelenks und ist für das seitliche Abspreizen und das Ziehen des Oberarmkopfes nach unten verantwortlich.

Der Unterschulterblattmuskel (M. subscapularis) dreht den Arm einwärts.

Der M. infraspinatus ist der untere Schulterblattgrätenmuskel, füllt die Fossa infraspinata aus und zieht von hinten über das Gelenk an den Insertionspunkt am Tuberculum majus humeri [12].

Der kleine Rundmuskel (M. teres minor) dreht zusammen mit dem M. infraspinatus den Arm auswärts.

Im Zusammenspiel sind die Muskeln für die Stabilisation des Schultergelenks verantwortlich. Außerdem Heben und Drehen sie den Arm und halten den Humerus in der Gelenkpfanne der Scapula zentriert. Die Verwachsung der Sehnenkappe mit der Gelenkkapsel hält diese in Form. Ebenfalls unterstützend sind verschiedene Bänder der Schulter (Ligamenti glenohumerales), das Acromion mit seinem Ligamentum coracoacromiale und das Coracoacromiale Gelenk [13].

Man unterscheidet partielle und komplette Rupturen einzelner oder mehrerer Sehnen der Rotatorenmanschette. Am häufigsten sind Rupturen oder Teilrupturen der Sehne des M. supraspinatus. Die Rupturen treten nach Unfällen wie Stürze oder Schulterverrenkungen auf. Mit zunehmendem Alter kann es durch Verschleiß und wiederholten Bagatelltraumen ebenfalls zu

Schädigungen kommen. Auch tritt die Erkrankung nach starken Dauerbelastungen auf.

Die Diagnose wird durch klinische Untersuchung mit Unterstützung verschiedener bildgebender Verfahren gestellt. Röntgenologische Untersuchungen in verschiedenen Ebenen und Stellungen der Schulter (neutral, einwärts- und auswärts rotiert) tragen zur Diagnose bei, indem ein Bild über die Veränderungen im knöchernen Bereich wiedergegeben wird. Die Computertomographie (CT) und die Magnetresonanztomographie (MRI) sind jedoch die Mittel der Wahl, um die Veränderungen der Weichteile der Schulter darzustellen, wobei es einige Studien darüber gibt, welche die Assoziation zwischen Rotatorenmanschettenrupturen und fettiger Degenerationen mit Muskelathrophie im MRI und CT darstellen [14-18]. Dort kann die Defektgröße, das Retraktionsausmaß und das Ausmaß fettiger Atrophie des zur Sehne gehörenden Muskels objektiviert werden. Als ein weiteres Diagnosemittel, neben der Arthroskopie, hat sich die Ultraschalluntersuchung durchgesetzt.

Ein vorerst konservativer Therapieversuch ist legitim. Dabei kommt es selten zum Verheilen der abgerissenen Teile am Ursprungsort. Häufig kann aber die Beweglichkeit für den Alltag wieder hergestellt und einer Versteifung des Gelenks entgegengewirkt werden. In den meisten Fällen vor allem bei unfallbedingten Rupturen ist jedoch eine operative Therapie von Nöten. Diese hat zum Ziel den Rotatorenmanschettendefekt wieder zu verschließen. Dabei wird versucht zusätzlich Engstellen im Gelenksbereich zu entfernen (Impingement), den Deltamuskelsansatz zu erhalten und postoperativen Adhäsionen vorzubeugen.

Mit der Arthroskopie könnten günstig gelegene und vor allem kleinere Läsionen repariert, sowie eine subakromiale Dekompensation durchgeführt werden. Hingegen sollten größere Läsionen in einer offenen Rotatorenmanschettenoperation versorgt werden [13, 19]

4.3 Die Muskeldegeneration nach Sehnenruptur beim Menschen und beim Schaf

Beim Menschen kommt es in Folge einer Sehnenruptur zur Retraktion der muskulotendinösen Einheit. In einer Studie von Bjorkenheim wurden die Struktur- und Funktionsveränderungen am M. supraspinatus am Kaninchen gezeigt [20]. Der Bewegungsumfang der Schultergürtelmuskeln beim Menschen beträgt nur ca. 3 cm. Die Retraktion an einer Schulter kann nach einigen Monaten über 6 cm betragen [21]. Die gefiederte Rotatorenmanschettenmuskulatur besitzt eine Faserlänge von 4,5-6 cm. Bei einer Muskelretraktion von 6 cm bedeutet das eine massive Veränderung der Muskelarchitektur.

In einer bereits durchgeführten Studie an Schafen wurde festgestellt, dass es zu einer Verkürzung der Muskelfasern sowie zu einer Zunahme des Fiederungswinkels kommt. Die langsa-

men Typ I Fasern degenerieren unter Entlastung wesentlich stärker als Typ IIA Fasern. Typ IIB Fasern degenerieren am wenigsten. Trotz der Veränderungen behält der Muskel allerdings seine kontraktile Funktion [22].

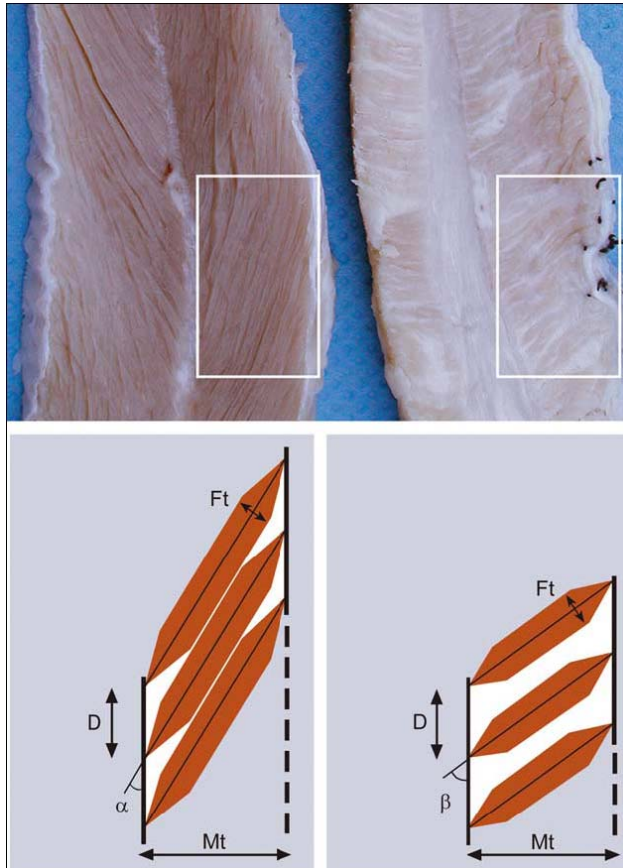


Abbildung aus:

Meyer, D. C., Hoppeler, H., von Rechenberg, B., and Gerber, C. A pathomechanical concept explains muscle loss and fatty muscular changes following surgical tendon release

Der Verlust der Muskelelastizität nach der Retraktion ist auf die Atrophie sowie eine fettige Infiltration zurück zu führen [1]. Nach Überschreiten eines kritischen Maßes an Muskelretraktion und fettiger Infiltration des Muskels, bedeutet das für die Klinik, dass die Sehne kaum mehr an seinen Insertionsort refixiert werden kann. Laut Nakagaki, Ozaki et al. kommt es auf die Einschätzung der Restfunktion des M. supraspinatus nach einer Rotatorenmanschettenruptur an, um eine Entscheidung über die anzuwendende Operationsmethode treffen und eine Prognose abgeben zu können [23].

Bei kleineren und frischen Sehnenrupturen kann der Muskel reinseriert werden. Falls bei einem Muskel schon eine fettige Degeneration oder Atrophie aufgetreten ist, findet hier auch nach Reinsertion kaum eine Rückbildung derselben mehr statt [24].

Dies wurde in der Literatur bei Goutallier, Postel et al. 1994 [25] nach rupturierten Sehnen des M. infraspinatus und M. subscapularis beobachtet. Nach fettiger Degeneration der Muskeln kommt es nach Rotatorenmanschettennaht kaum zu einer Regeneration der Muskulatur.

Beim M. supraspinatus kam es teilweise zur Regeneration, wenn zum Zeitpunkt der Operation das Degenerationsstadium 2 (siehe fettige Degenerationseinteilung nach Goutallier) noch nicht überschritten und die Supraspinatussehne isoliert rupturiert war [26].

Tabelle 1:

Goutallier et al.	Hounsfield Units	Daraus resultierende Fetteinteilung	Gewebeveränderung
0	> 50 HU	<10%	Normales Muskelgewebe
1	35-49 HU	11%-30%	Leichte fettige Einlagerung
2	25-34 HU	30%-49%	Deutliches Fettgewebe, aber mehr Muskelgewebe als Fett
3	15-24 HU	45%-55%	Gleich viel Fettgewebe wie Muskelgewebe
4	>14 HU	>55%	Mehr Fettgewebe als Muskelgewebe

Nakagaki und Ozaki et al. [21] untersuchten Schultern humaner Leichen mit bestehender Rotatorenmanschettenruptur. Sie fanden, dass die Verfettung nur eine geringe Korrelation zur Muskelatrophie und dem Patientenalter hatte. Die Muskelretraktion korrelierte jedoch sehr stark mit der Verfettung. Die Autoren postulieren einen retraktionsabhängigen Zusammenhang mit der Einlagerung von Lipofuszin in der Muskulatur, welche sie teilweise als Ursache für die fettige Degeneration diskutierten.

In einer experimentellen Studie beim Schaf wurde eine Methode zur optimalen Reparatur einer Rotatorenmanschettenruptur ermittelt [2]. In einer darauf folgenden Studie wurde beim Schaf die fettige Degeneration einer Rotatorenmanschettenruptur beim Menschen simuliert, indem eine Tenotomie der Sehne des M. infraspinatus vorgenommen wurde. Nach 40 Wochen wurde die Sehne wieder durch eine Naht repariert und dann 35 Wochen lang die Heilungs-

phase dokumentiert. Muskelatrophie und Muskeldegeneration waren auch hier kaum, bzw. nicht reversibel [27, 28].

Die Veränderungen im Muskel nach Sehnenruptur sind somit die limitierenden und gleichzeitig bislang irreversiblen Parameter, welche die Reparabilität einer Sehne bestimmen [2].

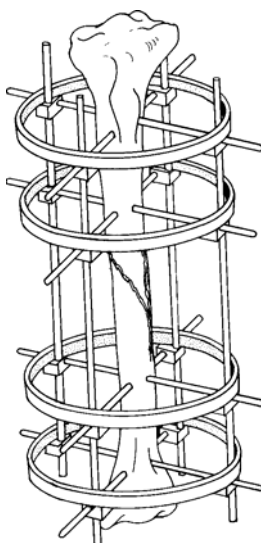
4.4 Operationsmethode nach Gavril Ilizarov als Grundidee

Die von Gavril Ilizarov (1921-1992) entwickelte Operationsmethode, wird vor allem bei Verlängerungs- und Korrekturosteotomien in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzt.

Die Methode basiert darauf, dass nach Durchtrennung der zu verlängernde oder zu korrigierende Knochen unter kontrolliertem Zug gehalten wird, um damit eine Art künstliche Wachstumsfuge zu erzeugen. Dieses Wachstum lässt die gleichen biologischen Vorgänge der Knochenneubildung erkennen, die auch im kindlichen Skelettwachstum beobachtet werden.

Ilizarov hat herausgefunden, dass, solange der Zug im richtigen Maße (ca. 1 mm/Tag) erfolgt, sowohl neuer Knochen angelegt wird als auch alle anderen Weichteilstrukturen wie Muskeln, Blutgefäße und auch Nerven mitwachsen.[29, 30].

In einer Studie von Ateslp und Yildiz et al. wurden 164 Frakturen mit Fixation nach Ilizarov behandelt. Pro 1cm Knochendefektheilung wurden ca. 2 Monate benötigt. Bei 50,7% traten Komplikationen in Form von Infektionen auf, die von den Eintrittsstellen der Nägel ausgingen. Ebenfalls traten Osteomyelitis als Spätfolge, aber auch Frakturen auf, wobei das Endergebnis der Frakturbehandlung jedoch insgesamt als gut zu beurteilen war [31].



(Abb. Ilizarov Apparat: Circular or ring fixator as deveoped by Ilizarov-
Textbook of Small animal surgery, second edition, Slatter, S.1644)

Diese Idee mit kontinuierlicher Spannung Knochen neu zu bilden, diente als Ansatz für die Muskelregeneration.

Matano und Tamai et al. stellten in einer Studie fest, dass die Stärke der Spannung der mechanische Stimulus für die Steuerung der Muskelmasse ist [32]. Die Art der Spannung (exzentrisch oder konzentrisch) scheint dabei keine Rolle zu spielen. Die Geschwindigkeit der Dehnung bei exzentrischer Belastung ist relevant, da zu langsame Dehnung eine Hypertrophie hervorruft, während zu schnelle Dehnung zu einer inhomogenen Degeneration (ähnlich neurogener Degeneration) führt [33-35].

In einem weiteren Experiment überdehnten dieselben Autoren die Unterschenkelmuskulatur von Kaninchen bis auf eine Sarkomerlänge von 3,5 μm . Die Muskulatur wurde unter passiver Spannung gehalten und hypertrophierte innerhalb von ca. 9 Tagen durch Bildung von Sarkomeren in die Länge, bis die ursprüngliche Sarkomerlänge von ca. 3,1 μm wieder erreicht war. Sie fanden somit eine Längs-hypertrophie mit Zunahme der Sarkomere in Serie unter Spannung des Muskels von ca. 15% in neun Tagen. Zusätzlich wurde eine Hypertrophie des Durchmessers der Muskulatur gefunden. Nach Matano et al. ist die Zunahme an der Muskel­länge für immobilisierten und frei beweglichen Muskel gleich [32].

5 Material und Methoden

5.1 Aufbau der Studie

Für die experimentelle Studie wurden 12 Schafe als Versuchstiere verwendet, wobei sich 2 Gruppen herauskristallisierten. Bei beiden erfolgte zu Beginn die Tenotomie der Sehne des M. infraspinatus der rechten Schulter. Der zweite Eingriff, der 16 Wochen später erfolgte, enthielt bei allen die Implantation eines speziell entwickelten Dehngerätes (siehe Abb.1, 2, 3). Die Dehnung wurde täglich um 1mm vorangebracht. In je 14-tägigem Abstand wurde bei beiden Gruppen nach der Implantation eine Computertomographie vorgenommen.

Nach erfolgter Dehnung der Sehne bis zum Insertionspunkt erfolgte die Refixation der Sehne des M. infraspinatus, der Zeitpunkt war bei Gruppe 1 ca. sechs Wochen nach der Implantation des Dehngerätes. In der Gruppe 2 erfolgte vor diesem Schritt der Refixation der Sehne die Euthanasie der Tier. Dies wurde auf Grund der dort entstandenen Komplikation entschieden. Nach 12-wöchiger Heilungsphase wurden auch die Tiere der Gruppe 1 euthanasiert.

5.1.1.1 Ankauf und Auswahl der Tiere

Die Tiere waren zu Beginn der Studie zwischen 1,2-1,5 Jahre alt (Schätzung des Zahnalters) und hatten ein Durchschnittsgewicht von 42,08 kg (von 41kg- 54kg). Nach einer Ankaufsuntersuchung im September 2004 wurden die Tiere mit Ivomectinium s.c. (1ml pro 50 kg Ivomec[®] ad us. vet. von Merial), Triclabendazol+Levamisol p.o. (Endex[®] 19,5%; 1ml/5kg; Novartis AG, Bale, Schweiz) und mit Netobimin p.o. (Hepadex[®] 15% 5ml/100kg ; Essex Tierarzney, Vertrieb Veterinaria AG, Bern, Schweiz) antiparasitär behandelt. Eine Impfung erfolgte mit dem Impfstoff Pulpyvax[®]-T s.c. (Essex Tierarzney, Vertrieb Veterinaria AG, Bern, Schweiz) zweimal im Abstand von 6 Wochen. Die Impfung umfasst ein Schutz gegen Tetanus und Breinierenerkrankung.

Während der Ankaufsuntersuchung wurde mit einem Vacutainer System (Belliver Industrial Estate, Plymouth, Grossbritannien) Blut entnommen und im Serum auf Maedi/Visna- Antikörper am Virologischen Institut des Tierspitals der Universität Bern untersucht. Alle Tiere waren negativ. Die Tiere bekamen bestandeseigene Ohrmarken und wurden alle 6 Wochen einer Klauenpflege unterzogen. Bis eine Woche vor den Operationen waren die Schafe auf einem externen Betrieb mit Weideaussgang.

5.1.1.2 Vorbereitung der Tiere

Eine Woche vor der ersten Operation wurden zwei Tiere in die Stallungen des Tierspitals verbracht und 24- 48 Stunden vor der Operation an der rechten Schulter und linken Halsseite

großzügig geschoren und gewogen. 24 Stunden vor dem Eingriff wurde den Schafen die Nahrung entzogen. Wasser stand zur freien Verfügung. Nach der Implantation der Dehngeräte (3. und 4. Operation) bis zur Euthanasie verblieben die Tiere in den Stallungen des Tierspitals.

5.1.2 Tenotomie der Sehne des M. infraspinatus

5.1.2.1 Operationsvorbereitungen

Am Tag der Operation wurden aus beiden Gruppen die Tiere vom jeweiligen Anästhesisten auf ihre Narkosefähigkeit, inklusive Herz- und Lungenauskultation und rektaler Temperatur, untersucht. Falls narkosefähig, erhielt es zur Sedation und Analgesie Medetomidin i.m. (0,005 mg/kg; Domitor[®]; Dr.E.Gräub AG, Bern, Schweiz) und Buprenorphin i.m. (0,01 mg/kg, Temgesic[®]; Essex Chemie AG, Luzern, Schweiz).

Eine halbe Stunde nach Prämedikation wurden die Tiere in den Operationsraum gebracht. Die linke geschorene Halsseite wurde mit Hibiscrub[®] (Chlorhexidini gluconas 40mg, Detergentis, Aromatica, Color: E124, Excipients ad Solutionem pro 1ml- Aseptische Waschdesinfektion zur Reinigung und Desinfektion der Haut; SSL Healthcare, Schweiz AG, Reinach/BL) gewaschen und mit Chlorhexidin und Alkohol (Hibitane[®] Tinktur; SSL Healthcare, Schweiz AG, Reinach/BL) gereinigt und desinfiziert. In die Vena jugularis wurde dann ein Venenverweilkatheter (Vagonüle S[®] G14; Vygon GmbH, Aachen, Deutschland) gelegt. Der Verschluss erfolgte mit einem IN- Stopper (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland), der mit dem Katheter verschraubt wurde.

Präoperativ erhielten die Tiere eine Antibiose, bestehend aus Benzylpenicillinum natricum 10 Mio IE/UI i.v. (Penicillin Natrium Vet.[®], 30000 I.U./kg; G. Streuli & Co. SA; Uznach, Schweiz), Gentamycin i.v. (Gentamycin[®] 100mg/ml, 6mg/kg; G.Streuli & Co. AG; Uznach, Schweiz) und ein nichtsteroidales Antiphlogistikum, welches in Form von Carprofen i.v. (Rimadyl[®] 4mg/kg; Pfizer, Vertrieb Dr.E.Gräub AG, Bern, Schweiz) verabreicht wurde. Die Spülung des Katheters erfolgte mit NaCl 0,9% (NaCl 0,9 %[®], Fresenius Kabi AG; Stans, Schweiz).

Zur Einleitung der Narkose wurden Ketamin i.v. (Narketan 10[®], 2mg/kg; Vetoquinol AG, Belp-Bern, Schweiz) und Diazepam i.v. (Valium[®], 0,1 mg/kg; Roche Pharma AG, Reinach, Schweiz) verwendet. Propofol i.v. (2-4 mg/kg) wurde bei Bedarf zur Intubation benutzt. Der Kehlkopf wurde mit mehreren Hüben Lidocain lokal betäubt (entspricht 10mg; Xylocain[®] Spray, Astra Pharmaceutica AG, Dietikon, Schweiz). Danach wurden die Schafe mit Endotrachealtuben der Grössen 9 und 10 intubiert. Die Inhalationsnarkose zur Aufrechterhal-

tung der Narkose erfolgte aus einem Gemisch Isofluran (Forene[®]; Abbott AG, Baar, Schweiz), Sauerstoff und Luft je nach Gewicht und Allgemeinanästhesieverlauf. Zur Schützung des Auges vor Austrocknung der Cornea bekamen die Tiere Vitamin A Augensalbe (Dispera[®] Novartis AG, Bale Schweiz) ins Auge eingebracht.

5.1.2.2 Lagerung und Desinfektion

Die Lagerung erfolgte in linker Seitenlagerung auf der kontralateralen Seite zum Operationsfeld. Zwischen die 2 Vorderbeine wurde eine Rolle zur Unterstützung des rechten Beines gelegt. Das untere linke Bein wurde angewinkelt, um nicht im Operationsfeld zu stören. Das rechte Vorderbein bekam eine leichte Wickelung im Schulter und Ellenbogengelenk und wurde so fixiert.

Das Operationsfeld wurde aseptisch mit Hibiscrubseife, Alkohol, Hibitan-Desinfektionsspray vorbereitet.

5.1.2.3 Operationsverlauf

Der operative Zugang erfolgte mit einem transversalen Hautschnitt über dem Tuberculum majus. Auftretende kleinere Blutungen wurden mit einem Elektroauter (Berchtold Elektrotom 80; Vertrieb Hausmann, St. Gallen, Schweiz) gestillt. Nach Freipräparieren der Infraspinatussehne unter dem M. deltoideus wurden aus dem M. infraspinatus 4 Biopsien 4-6cm über dem Acromion entnommen. Die Biopsien sollten mindestens eine Größe von 2x2mm besitzen. Die Insertion der Sehne wurde mit der Knochensäge unter Herausnehmen eines V-förmigen Knochenchips vom Tuberculum majus humeri gelöst. In den Knochenchip wurden 2 parallele Bohrungen eingebracht. Das Ende der Sehne wurde mit einem nichtresorbierbaren Faden (2/5.0 metric FiberWireTM, Arthrex, München) durch die Bohrungen über Kreuz um den proximalen Abschnitt des Knochenchips fixiert, bevor sich der Muskel retrahieren konnte. Danach folgte die Messung der Muskelelastizität mit der Federwaage (Abb.9). Weiterhin wurde ein Silikonschlauch (Silicone Penrose Drain, 12 mm Durchmesser; Fortune Medical Instrument, Taipei, Taiwan) über das Ende der Sehne inklusive des Chips und des Fadens gezogen, damit keine Verklebungen entstehen und die Sehne nicht spontan verheilen konnte.

Die Muskelschicht und Subkutis wurden mit einer fortlaufenden Kürschnernaht und einem resorbierbarem Vicryl[®] 2/0-Faden genäht. Die Kutis wurde mit einem nicht-resorbierbaren Supramid[®] 2/0 Faden (Braun/Aesculap AG & CO.KG, Tuttlingen, Deutschland) mit Einzelheften verschlossen. Nach der Operation wurden die Tiere jeweils einzeln in Anästhesie in die Computertomografie gefahren.

Im Computertomographen wurde versucht das Tier mit dem Kopf Richtung Scanner, in linke Seitenlagerung zu verbringen und die beiden Vorderbeine parallel, mit Beugung des Karpalgelenkes, nach hinten ziehend zu lagern, um möglichst eine parallele Stellung der beiden Schultern zu erreichen. Die Spinae scapulae sollten in einer Ebene mit der Untersuchungsebene liegen.

Die CT- Schnitte erfolgten in einer Dicke von 2 mm und einem Abstand von 5 mm. Der Thoraxausschnitt schloss den kompletten M. supraspinatus und M.infraspinatus mit ein. Nach der Untersuchung wurden die Tiere in die Aufwachboxen verbracht.

5.1.2.4 Operationsnachsorge

Unter Kontrolle eines Anästhesisten wurden die Tiere in eine Einzelbox mit Sichtkontakt zu Artgenossen verbracht und bis zu den ersten Aufstehversuchen und Futteraufnahme regelmäßig kontrolliert. Wenn die Tiere wieder vollständig aus der Allgemeinanästhesie erwacht waren, kamen sie zu zweit oder zu dritt für ca. 2-3 Wochen in Boxen. Danach konnten sie sich beim Weidegang bis zur nächsten Operation in 12 Wochen frei bewegen.

5.1.3 Fixation des Spanners

5.1.3.1 Operationsvorbereitungen

Die Operationsvorbereitungen verliefen wie unter 3.2.1 besprochen. Vor der Implantation des Dehnapparates wurde bei den Tieren wiederum ein CT, wie unter 3.2.3 angefertigt. Danach transportierten wir die Tiere narkotisiert auf einem Wagen in den Operationsraum.

5.1.3.2 Lagerung und Desinfektion

Die Lagerung glich der unter 6.1.1.2 beschriebenen. Unterschiedlich dazu wurde unter die rechte Schulter eine Rolle Watte zum Anheben des gesamten Schultergürtels gelegt. Das linke Bein wurde ohne Fixation belassen, damit es während der Operation frei bewegt werden konnte. Das Operationsfeld wurde wie bereits besprochen vorbereitet.

5.1.3.3 Operationsverlauf

Die Eröffnung der Operation begann mit einem transversalen Hautschnitt über dem Tuberculum majus humeri und führte über die Spina scapulae Richtung Rückenlinie. Nach Freipräparation der Infraspinatussehne unter dem M. deltoideus wurden aus dem M. infraspinatus wiederum 4 Biopsien entnommen (3 Histologieproben in Isopentan und flüssigen Stickstoff und 1 Probe in Glutaraldehyd (6,25% Glutaraldehyd in 0,1M sodium cacodylate puffer bei pH7,4, 1150 mOsm). Es folgte die Mobilisation der Sehne und der daran befindlichen nichtresorbierbaren Fäden (2/5.0 metric Fiber-WireTM). Der Penrose Drain wurde dabei abgelöst. Danach

folgte die Messung der Muskelelastizität mit einer Federwaage (Abb.9).

Mittels eines „Speers“ wurde der Draht des Dehnapparates (Abb.7) unter der Subkutis durchgeleitet und perforierte die Haut in der Höhe, in der der Draht die geringste Beweglichkeit und den geringsten Widerstand durch die Bewegung des Schulterblattes aushalten musste. Es sollte noch genügend Abstand zu der Platte bestehen, damit die Dochtwirkung, im Falle einer Infektion, nicht bis zur Platte vordringen würde. Danach wurde die Drehkappe wieder angebracht. Daraufhin wurde der Spanner an die Spina scapulae angebracht und zwar so weit in Richtung Acromion wie möglich (Abb.4). Die Fixation mit winkelstabilen Schrauben und der dazugehörenden Platte war der nächste Schritt. Die Schraubenlöcher enthielten hierbei ein passendes Gewinde zur Schraube, damit der Kopf komplett in der Platte versenkt werden konnte. Die Platte wurde mit 4 Schrauben befestigt. Das Ende der Sehne wurde wiederum mit einem Penroseschlauch versehen, die Fäden am Ende des Spanners durch eine Öse mit 7-8 Knoten verbunden und der Faden verkürzt. Bei der Befestigung wurde darauf geachtet, dass alle Fäden auf dem Spanner nicht spontan verrutschen konnten. Die Sehne wurde durch auf Spannung gebracht und die Wunde wie folgt verschlossen. Die Muskelschicht und die Subkutis wurden mit einer fortlaufenden Naht und einem resorbierbarem 2-0 Vicryl-Faden genäht. Die Kutis wurde mit einem Skin-Stapler (Appose ULC®; Vertrieb B. Braun Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) geklammert. Über den herausstehenden Draht wurde ein Schutz in Form eines Stoffsäckchens an die Haut genäht, damit die Tiere nicht am Draht hängen bleiben konnten (siehe Abb.10).

5.1.3.4 Operationsnachsorge

Die Nachsorge verlief wie unter 3.2.4 beschrieben

Einen Tag nach der Operation wurde mit dem Dehnen der Sehne begonnen. Die Dehnung erfolgte durch 2 komplette Umdrehungen des aus der Haut herausragenden Drahtes. Nach jeder Umdrehung kommt es zu einem leichten Einrasten, damit jede Drehung genau abgegrenzt werden kann. Bei 2 Umdrehungen entsprach die Drehung einer Strecke von 1mm. Durch Errechnen der Strecke anhand der CT-Bilder konnte errechnet werden, nach wie vielen Tagen und welcher Strecke die Sehnen wieder an ihrem Insertionspunkt sein würden und das Reattachment erfolgen konnte. Tägliche Säuberung und Desinfektion der Austrittsstelle mit Betadine® sollten eine Infektion der Austrittswunde des Drahtes verhindern.

5.1.4 Computertomographiekontrollen

In 14-tägigen Abständen wurde nach der Dehnapparatimplantation eine Verlaufs-kontrolle angefertigt. Die Schafe wurden dafür wie unter 3.2.1 beschrieben vorbereitet. Die Untersuchung wurde wie unter 3.2.3 durchgeführt.

5.1.5 Reattachment der Sehne

Diese Operation wurde nur noch bei den Tieren der Gruppe 1 durchgeführt. Die Gruppe 2 wurde zu diesem Zeitpunkt euthanasiert und seziert (wie unter 6.1.6 beschrieben).

5.1.5.1 Operationsvorbereitungen

Die Operationsvorbereitungen entsprachen denen unter 3.2.1. beschrieben.

5.1.5.2 Lagerung und Desinfektion

Die Lagerung erfolgte wiederum wie unter 6.1.3.2 beschrieben.

5.1.5.3 Operationsverlauf

Der Hautschnitt über dem Tub.majus führte über die Spina scapulae Richtung Rückenlinie. Nach Freipräparation der Infraspinatussehne und des M. infraspinatus unter dem M. deltoideus wurden aus dem M. infraspinatus wiederum 4 Biopsien entnommen (3 Histologieproben wurden 30sec. in Isopentan und anschließend in flüssigem Stickstoff gefroren, und 1 Probe wurde in Glutaraldehyd fixiert).

Der nächste Punkt war die Messung der Distanzen: von 1) Mitte-Chip zu Spanner, 2) Mitte Chip zu Insertionsstelle, 3) Chip zu Akromion und 4) Ausfahrlänge des Spanners (Abb. 8, 9). Die Sehne wurde vom Spanner getrennt. Daraufhin erfolgte die Explantation des Spanners von der Spina scapulae. Es wurden 2 neue Fäden (FiberWire #5, Arthrex, München) an den Chip angebracht und die Muskelelastizität mittels Federwaage gemessen. Das Attachment der Sehne erfolgte mittels einer transossären Schraube (3,5 mm Durchmesser mit einer Länge von 40 mm) mit Unterlegscheibe an der ursprünglichen Ansatzstelle der Sehne am Humeruskopf (Abb. 5). Hierfür wurde erst das nötige Loch mit einer Bohrmaschine gebohrt, um anschließend die Schraube mit der Unterlegscheibe und den daran befestigten Fäden einzudrehen.

Die Muskelschicht und Subkutis werden mit einer fortlaufenden Naht und einem resorbierbarem 2-0 Vicryl-Faden genäht. Die Kutis wurde mit einem nicht-resorbierbaren Faden (Supramid® 2/0) durch Einzelhefte verschlossen.

5.1.5.4 Stützverband

Um ein Abstellen der Gliedmaße zu verhindern, erhielt jedes Tier eine halbe Holzkugel in einem Durchmesser von ca. 10 cm mit der glatten Seite unter die Klauen geklebt. Auf diese Weise konnte eine große Belastung auf der refixierten Sehne vermieden werden. Die Polsterung mit Watte erfolgte zwischen den Klauen und unter den Afterklauen. Die gesamte Gliedmaße inklusive des Karpalgelenkes wurden mit Watte eingewickelt. Danach folgte eine Schicht mit elastischem Mull und anschließend eine Schicht mit elastischer Binde (Isoelast[®] Pflasterbinden von IVF Hartmann AG, CH-Neuhausen). Um den Verband etwas wasserdichter und belastbarer zu gestalten, wurde als Abschluss schwarzes Tesa-Klebeband (Tesaband universal, 04541 schwarz, Tesa AG Hamburg) verwendet (Abb. 16, 17).

5.1.5.5 Computertomographie

Die Tiere wurden nach dem Anlegen des Stützverbandes in Allgemeinanästhesie direkt ins CT transportiert, welches wie unter 3.2.3 angefertigt wurde.

5.1.5.6 Operationsnachsorge

Noch auf dem CT-Tisch wurden die Tiere in ein Netz gelegt. Das Netz diente den Tieren als Stütze, da sie sich nicht hinlegen sollten. Das Risiko, dass beim Aufstehen die reparierte Sehne erneut reißt, war zu hoch. Die Schafe konnten sich zum Ausruhen wie bei einer Hängematte in die Netze hängen. Die Verbände wurden 1mal pro Woche gewechselt. Die Schafe verbrachten die nächsten 6 Wochen in dem Hängesystem, bevor sie sich noch einmal 6 Wochen ohne Verband und Netz frei in der Gruppe zu zweit oder zu dritt bewegen konnten (Abb. 16, 17).

5.1.6 Euthanasie und Sektion

Nach Beendigung der freien Bewegungsphase wurden die Tiere noch einmal einer Untersuchung im CT unterzogen, wobei Vorbereitungen und die Ausführung wie unter Punkt 3.2.1 und unter 3.2.3 beschrieben durchgeführt wurden. Danach erfolgte wieder der Transport in den Operationsraum. Dort wurden unter Anästhesie Biopsien des M. infraspinatus von der reinserierten, sowie der kontralateralen unveränderten Seite gewonnen. Ebenfalls wurden Biopsien des Fettgewebes auf der unveränderten Seite entnommen. Danach wurden die Tiere mittels einer Überdosis Pentobarbitalium natricum i.v. (Vetanarcol[®] ad us. vet, 1-2ml/KGW) euthanasiert. Die Vordergliedmaßen inklusive der Schulterblätter (inklusive der Muskulatur) wurden entnommen (12, 13, 14, 15) und für eine Untersuchung im MRI (Magnetic Resonance Imaging) im Universitätsklinikum Balgrist in Zürich aufbewahrt.

5.1.7 Untersuchungsmethoden

5.1.7.1 Histologie

Immunhistochemische Färbung zur Bestimmung des Muskelfasertyps

Für die Färbung benötigten wir Gefrierschnitte. Diese wurden wie folgt angefertigt:

Die oben beschriebenen Muskelproben wurden im Leica CM 3050 Kryostat so positioniert, dass die Schnittführung mehrheitlich senkrecht zur Faserrichtung erfolgte. Die Schnitte wurden bei minus 19°C - 22°C geschnitten, wobei 5µ dicke Kryoschnitte angefertigt wurden. Diese Schnitte wurden auf Superfrost[®]plus – Objektträgern bis zu 24 Stunden luftgetrocknet, um sie danach 10 min. in Aceton für die Antikörper- und HE- Färbung zu fixieren. Die 10 minütige Fixierung in 4% Formalin wurde zur Vorbereitung der Ölotfärbung und HE-Färbung durchgeführt [36]. Die Lagerung der Schnitte über Nacht erfolgte bei 4°C.

Die Muskelschnitte durchliefen eine Antikörper-Doppelfärbung (DakoCytomation, EnVision[®], Doublestain System Code K1395) zur Differenzierung der einzelnen Muskelfasertypen um deren quantitativen Veränderungen zu den verschiedenen Zeitpunkten zu messen.

Nach dem Blockieren der endogen Peroxidase (Inkubationszeit 5 min) wurde der Schnitt mit Waschpuffer gespült und danach 3-5 min in ein frisches Pufferbad gestellt. Eine Proteinblockierung (DakoCytomation, Protein Block Serum Free Code X0909) für 10 min bei Raumtemperatur schloss sich an. Anschließend folgte der erste Primärantikörper bei 37°C für eine Stunde in der Feuchtkammer mit anschließender Pufferwaschung (Antikörper und Verdünnung siehe Tabelle Nr.2). Nach einer 30 minütigen Inkubation der ersten Peroxidasekonjugates bei Raumtemperatur EnVisionTM- Polymer(EnVisionTM /HRP) erfolgte wieder eine Pufferwaschung. In der ersten Chromogenlösung wurde Diaminobenzidin (DAB) verwendet (10 min bei Raumtemperatur-1Tropfen/ml). Die Spülung erfolgte mit destilliertem Wasser. Das Elutionsreagenz (Doublestain Block) wurde für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Einsatz des zweiten Primärantikörpers und anschließender Waschung, wurde das zweite EnVisionTM –Polymer, das Alkalische Phosphatasekonjugat (EnVisionTM /AP) eingesetzt. Es folgte eine Pufferwaschung und danach die zweite Substrat-Chromogenlösung (Fast Red), die 10 min bei Raumtemperatur bei 1 Tablette/3 ml eingesetzt wurde. Das Spülen mit destilliertem Wasser ging der Gegenfärbung mit Counterstain/Hämatoxilin voraus. Als letzter Schritt

wurden die Schnitte mit Mount coverslips (Kaisers Glyceringelantine C3 H8 O3, Merck AG Darmstadt) gedeckt. PBS diente als Negativkontrolle (Abb. 18, 19).

Tabelle 2:

Antikörper gegen	Hersteller	Verdünnung	Antikörpertyp
Myosin Typ I	Sigma-Aldrich Saint Louis, Missouri, USA	1:500	Monoklonal Anti-Myosin (Skeletal,Slow) antibody produced in mouse (M8421)
Myosin Typ II	Sigma-Aldrich Saint Louis, Missouri, USA	1:500	Anti-Myosin IIb, non-muscle antibody produced in rabbit (M7939)
Myosin Typ IIb	Sigma-Aldrich Saint Louis, Missouri, USA	1:10	Monoklonal Anti-Myosin (Skeletal,Fast) antibody produced in mouse (M4276)

Die Auswertung der Antikörperfärbung erfolgte aufgrund der unterschiedlich ange-färbten Muskelfasern. (Typ I gegen Typ II).

Tabelle 3:

Färbung / Typ	Typ I	Typ II	Typ IIB
Typ I gegen Typ II	rosa	braun	-----
Typ I gegen Typ IIB	rosa	ungefärbt	Braun
Typ II gegen Typ IIB	ungefärbt	rosa	Braun

Weiterhin wurden eine Ölrotfärbung (siehe Abb.20, 21) sowie eine HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung: siehe Abb. 24, 25, 26) nach standardisierten Methoden angefertigt. Die HE-Färbung diente lediglich als Kontrollfärbung. In der Ölrotfärbung wird das Fett rot gefärbt und die Muskeln blau.

Für die Auswertung der einzelnen Färbungen wurden die Schnitte mit einem Mikroskop (Leica MDL 505097[®]) betrachtet. Die gewünschten Bereiche der Ölrot-färbung wurden mit einer fünffachen Vergrößerung ausgewählt (Abb. 20, 21), die Antikörperfärbung (Abb. 18, 19) und HE-Färbung (Abb. 24, 25, 26) erfolgte bei einer 40-fachen Vergrößerung. Diese Ausschnitte

wurden als digitale Bilder im TIF- Format über eine Kamera (Leica DC 200[®]) mit einer speziellen Software (Leica IM1000[®]) in den Computer eingelesen.

Der Verlauf der Veränderungen der Menge und des Durchschnittes von Typ I, Typ II und Hintergrund (Blutgefäße, Fett, Artefakte) während der einzelnen Operations-zeiträume wurden in der Antikörperfärbung quantitativ vorgenommen, die Veränderungen der Menge der Fettmenge zu den verschiedenen Zeitpunkten in der Ölrotfärbung. Die Einteilung der unterschiedlichen Probenentnahmen wurde an die verschiedenen Operationen gekoppelt und wurde wie folgt unterteilt.

- Tenotomie: 0Tage
- Implantation: 12 Wochen
- Refixation: 18 Wochen (nur Gruppe 1)
- Euthanasie: 30 Wochen
- Kontrolle: Kontrollseite zum Euthanasiezeitpunkt

Die vier vorzeitig euthanasierten Tiere wurden separat ausgewertet und dienen als eigenständige Gruppe 2. Diese dienen als Kontrolle und Orientierung für die acht reinserierten Tiere. Die Ausschnitte der Färbungen wurden so ausgewählt, dass die größte mögliche Menge an quer getroffenen Muskelfasern zur Auswertung standen. Anhand eines Bildanalyseprogramms (Leica[®] Qwin, Leica Microsystems) nach Anfärben der gewünschten Bereiche mit dem Programm Adobe Photoshop[®] konnten die gewünschten Bereiche ausgezählt und mittels Microsoft Excel festgehalten werden (Abb. 18, 19).

In der Antikörperfärbung unterschied man die einzelnen Muskelfasern (Typ I /Typ II) und den Hintergrund mit Fett, Blutgefäßen und Artefakten. In der Ölrotfärbung erfolgte eine Unterscheidung in Muskel, Fett und Hintergrund.

Die Durchmesser wurden mit dem Messmodul des Programms Leica IM1000[®] ausgemessen und in eine Exceltabelle für die Statistik übertragen (Abb. 22, 23). Für jeden Muskelfasertyp wurden zu jedem Zeitpunkt 10 Durchmesser gemessen.

5.1.8 Statistische Auswertung

Die Auswertung der quantitativen Messergebnisse wurde mit dem Statistikprogramm SPSS Version 11.0 for MAC OSX durchgeführt. Einfaktorielle Varianzanalysen (Anova- Test) wurden verwendet, um statistisch signifikante Unterschiede der Gruppen zu ermitteln, wobei p-Werte $<0,05$ als statistisch signifikant angesehen wurden. Als Posthoc Tests wurden die Tests nach Scheffe angewandt.

Die **Resultate** der Computertomographie, Dehnungsmessungen und Magnetresonanztomographie sind Gegenstand nachfolgender Publikationen (C. Gerber et al.).

6 Resultate

6.1 Operationen und postoperative Phasen

Die Tenotomie konnte bei allen 12 Schafen wie geplant durchgeführt werden. Bei 4 Tieren (Gruppe 2: 2208, 2209, 2211, 2212) entstanden leichte Serome, die nach wenigen Tagen jedoch vollständig resorbiert wurden. Die Anästhesie wurde von allen Tieren gut überstanden.

Die Implantation des Dehnapparates (Abb. 6, 7) verlief bei allen Tieren komplikationslos. Die Schwierigkeit bei der Operation bestand in der unterschiedlichen Retraktion der Sehnen, der Abkapselung des Knochenstücks durch Bindegewebe und Vernarbung der Sehnenanteile und somit im Freipräparieren des Knochenchips. Das tägliche Drehen des Spannapparates führte bei einzelnen Tieren zu Problemen, da der Draht von Bindegewebe fest ummantelt und im Drehgelenk schließlich der Draht blockiert wurde. Deshalb erhielten die Schafe 2204 und 2203 innerhalb der ersten Woche einen neuen Dehnapparat, da der Draht während der Dehnung abgebrochen war. Beim Schaf 2201 wurde zum Zeitpunkt der 2. Computertomographie festgestellt, dass die Fäden zwischen dem Chip und dem Dehnapparat gerissen waren. Dies konnte in einer Operation am selben Tag repariert werden. Beim Tier 2003 brach der Draht an der Übergangsstelle zu der Platte ab. Der Draht wurde 14 Tage nach der Implantation des Dehnapparates zum Zeitpunkt der ersten Kontrollcomputer-tomographie wieder erneuert. Der Draht brach ebenfalls beim Tier 2204, hier 3 Tage nach der Implantation. Direkt am vierten Tag wurde der komplette Dehnapparat bei diesem Schaf erneuert. Zum Zeitpunkt der 2. CT-Kontrolle wurde bei den Tieren 2212, 2207 der ausgebrochene Dehnapparat an der Spina scapulae mit Muttern an den Schraubenenden befestigt. Das Schaf 2008 erhielt ebenfalls einen neuen Dehnapparat, da dieser an der Spina scapulae ausgebrochen war. Dieser wurde jedoch zur ersten CT-Kontrolle ohne Muttern behoben.

An der Austrittsstelle konnte bei den meisten Tieren trotz täglicher Reinigung und geübter Vorsicht die Entstehung von Wundinfektionen nicht verhindert werden. Während bei allen anderen Tieren diese lokal um die Eintrittsstelle lokalisiert blieben, schritt die Infektion bei 4 Tieren nach kaudal fort und erfasste schließlich den Sehnenstumpf. Wegen dieser Infektionen über dem Dehnapparat wurde bei den Schafen 2202, 2205, 2206, 2210 keine Sehnenrefixation durchgeführt und die Tiere wurden euthanasiert (Abb. 6), wobei wir die entnommenen Biopsien und Messwerte zu einer Kontrollgruppe (Gruppe2) zusammenfassen konnten. Zusätzlich hatten die Tiere 2204, 2207, 2208 und 2212 leichte Entzündungen an der Austrittsstelle. Diese wurden mit Antibiose und täglicher lokaler Reinigung versorgt.

Die Sehnenrefixation (siehe Abb. 5) wurde bei insgesamt 8 Schafen (Gruppe 1) durchgeführt (2201, 2203, 2204, 2207, 2208, 2209, 2211, 2212).

Beim Dehnapparat des Schafes 2201 waren alle Schrauben gelockert und der Knochenchip war längs in 2 Teile zerbrochen. Trotzdem konnte eine Refixation der Sehne durchgeführt werden. Auch beim Schaf 2208 hatten sich 2 Schrauben gelockert. Eine weitere Schraube des Dehnapparates lag im umliegenden Gewebe beim Schaf 2207.

Die anschließende Periode nach der Refixation in dem Aufhängesystem mit Stützverband (Abb. 7) wurde von allen 8 Schafen gut toleriert. Schaf 2208 und 2212 bekamen leichte Decubitalstellen an den Karpalgelenken, dies führte jedoch durch Salbenverbände und stärkere Polsterung direkt zu einer komplikationslosen Heilung.

Beim Schaf 2204 entstand ein Abszess über der Fixationsschraube, der nach entsprechender Wundtoilette und Antibiose ebenfalls vollkommen abheilte.

6.2 Makroskopische Beurteilung zum Zeitpunkt der Euthanasie

Bei der Sektion der Schafe 2202, 2205, 2206, 2210, die vor der Refixation euthanasiert wurden (Gruppe 2), wurden jeweils Abszesse über dem Bereich des Dehnapparates gefunden (siehe Abb. 12-15). Eine Lockerung von allen Spannerschrauben trat bei den Schafen 2202, 2205 und 2206 auf. Die Chips/Sehnen der Tiere 2205, 2206, 2210 waren nicht mehr mit dem Dehnapparat verbunden. Das Sehnengewebe war vermutlich durch die Infektion brüchig geworden und hielt der Spannung nicht mehr stand.

Die Schraube, die zur Fixation der Sehne diente, war bei Schaf 2204 gebogen, wobei die Sehne verheilt schien. Bei Tier 2212 war die Schraube gebrochen. Bei den übrigen 2 Tieren war die Schraube in Position und stabil. Die Fäden zwischen Chip und Schraube waren in Takt und die Knochenchips mit der Sehne verheilt.

6.3 Histomorphometrie

6.3.1 HE- Färbung

Diese Färbung wurde als Kontrolle der weiteren Färbungen angefertigt, um einen Überblick über die Resultate und deren Aussagekraft zu bekommen.

Der Ursprungsmuskel zum Zeitpunkt der Tenotomie und die Gegenseite zum Zeitpunkt der Euthanasie zeigten in beiden Gruppen ein ähnliches Bild. Die Muskelfasern lagen dicht aneinander (Abb. 24) und ohne große Zwischenräume (Fett, Bindegewebe) nebeneinander. Falls die Muskelfaszie mit angeschnitten worden war, wurden dort vereinzelt Fettzellen beobachtet. Fokal angeordnete Lymphozyten und neutrophile Granulozyten wurden ebenfalls vereinzelt

in den Schnitten gefunden, sowie Blutgefäße und etwas Bindegewebe.

Zu allen Zeitpunkten waren in einigen Muskelfaserbündelanschnitten wenige Sarkosporidien (Parasiten) zu sehen. Da diese keine klinische Erkrankung der Tiere verursachen, können sie vernachlässigt werden.

Zum Zeitpunkt der Implantation und Refixation der Sehnen waren deutlich vermehrt Fettzellen zwischen den Muskelfaserbündeln zu finden. Ebenfalls traten vereinzelt neutrophile Granulozyten auf. Bei den Tieren mit massiven Entzündungen waren die Entzündungszellen vermehrt, aber nicht in grossen Massen zu finden.

Es trat vermutlich eine Ödematisierung der Fasern auf, da der Durchmesser der Faserbündel vergrößert schien. Andererseits war auch eine massige Atrophie der Fasern zu beobachten (Abb. 25, 26).

Die Fasern im Zeitpunkt der Euthanasie hatten sich, ohne sie jedoch detailliert ausgewertet zu haben, nicht stark zu den zwei vorherigen Zeitpunkten verändert. Es traten vereinzelt neutrophile Granulozyten und auch perivaskuläre Ödematisierungen auf. Zusätzlich waren etwas häufiger (eventuell auch zufällig getroffene) Gefäße zu sehen.

6.3.2 Antikörperfärbung

Die Auswertung umfasste nur die Antikörperfärbung Typ I gegen Typ II. In der Färbung Typ I gegen Typ IIB und Typ II gegen Typ IIB war keine Unterscheidung in der Typ II Fasern in Typ IIA und Typ IIB möglich. Zur Kontrolle wurden Färbungen an Probemuskeln (*M. tibialis cran.*, *M. longissimus dorsalis*), wie bei Peinado et al. beschrieben, durchgeführt. Doch auch in diesen konnten keine Unterscheidungen gesehen werden. Ebenfalls wurden Färbungen mit der Myosin-ATP-ase, wie in Peinado et al.[9] und Eggenberger [36] durchgeführt, die aber auch nicht zu einer Differenzierung der Typ II Fasern führten.

Aufgrund dieser Vorarbeit entschieden wir uns nur die Antikörperfärbung Typ I gegen Typ II auszuwerten, da in diesen die Muskelfasertypen sicher angefärbt werden konnten (Abb. XX, S. 34).

Die Typ I Fasern der *Gruppe 1* (Tiere die nach der Refixation der Sehne euthanasiert wurden) zeigten zum Zeitpunkt der Tenotomie einen fast gleichen Durchschnittswert, wie die in der Kontrollgruppe, womit diese als Vergleichsgruppe akzeptiert werden konnte. Über den Zeitverlauf wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich des Anteils der Typ I Fasern beobachtet. Als Trend ließ sich jedoch erkennen, dass die Menge an Typ I Fasern ausgehend von der Implantation über Refixation, Euthanasie jeweils rückläufig war.

In der *Gruppe 2* (Tiere die vor der Refixation der Sehne euthanasiert wurden) war der Ab-

wärtstrend der Typ I Fasern deutlicher zu erkennen. Dort trat über den Zeitverlauf ein sehr hoher signifikanter Unterschied auf ($p < 0,001$, Power=0,994). Beim Vergleich der einzelnen Zeitpunkte untereinander traten folgende Signifikanzen auf (nach Scheffe):

- Tenotomie zu Euthanasie ($p=0,008$)
- Implantation zu Euthanasie ($p < 0,001$)
- Kontrolle zu Euthanasie ($p=0,028$)

In der *Gruppe 1* wurde bei den Typ II Fasern über die Zeit insgesamt ein hoher signifikanter Unterschied beobachtet ($p=0,007$; Power=0,876). Dabei nahmen die Fasern vom Zeitpunkt der Tenotomie bis zur Refixation ab. Im Unterschied zu Typ I nehmen jedoch die Typ II Fasern vom Zeitpunkt der Refixation zur Euthanasie hin tendenziell wieder zu. Die Menge der Fasern waren fast auf den Ausgangspunkt zum Zeitpunkt der Tenotomie hochgegangen. Vergleicht man die statistische Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen, war diese nur zwischen der Tenotomie und dem Refixationszeitpunkt signifikant ($p=0,023$).

Ein sehr hoher signifikanter Unterschied der Typ II Fasern im Zeitverlauf ($p < 0,001$; Power=0,983) war zwischen den einzelnen Zeitpunkten in *Gruppe 2* zu finden. Dort nahmen die Fasern vom Tenotomiezeitpunkt bis zur Implantation ab. Während der Dehnzeit und den hier vorhandenen Komplikationen, kam es zu einer Zunahme der Fasern mit signifikantem Unterschied zwischen dem Zeitpunkt der Implantation und der Euthanasie ($p=0,011$). Signifikante Unterschiede traten zusätzlich zwischen dem Zeitpunkt der Tenotomie und der Kontrollseite ($p=0,032$) auf, wobei die Menge der Typ II Fasern der Kontrollseite deutlich höher waren. Zwischen dem Zeitpunkt der Implantation und der Kontrollseite ($p=0,002$) war dieser Unterschied noch deutlicher zu sehen. Zum Zeitpunkt der Tenotomie war der Anteil der Fasern ca. 11% weniger als zum Zeitpunkt der Euthanasie an der Kontrollseite.

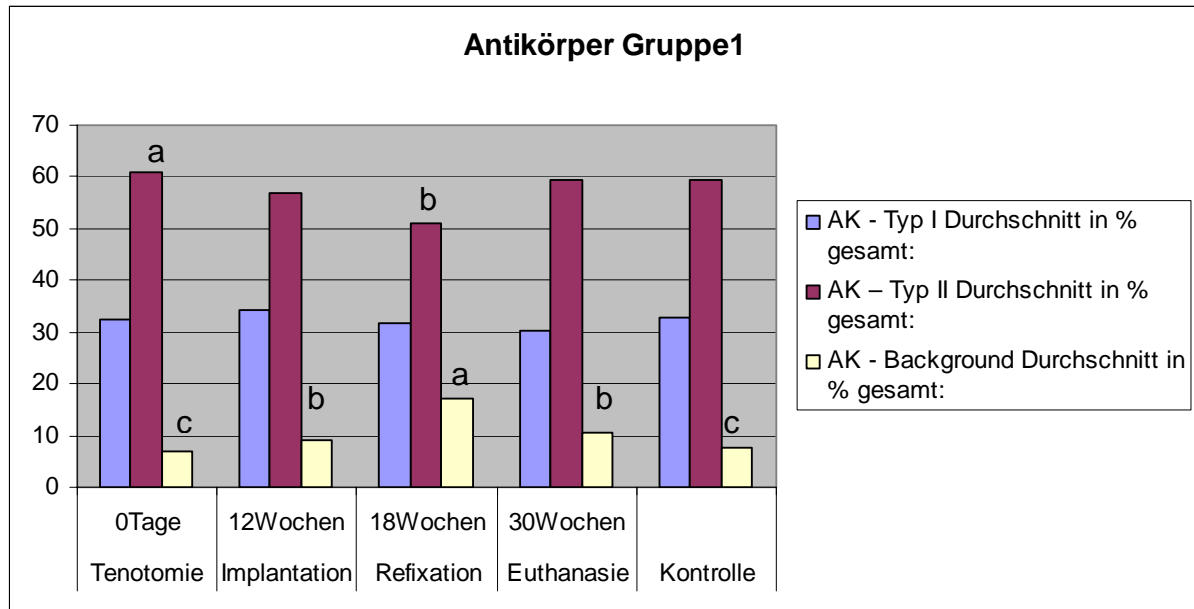
Die Messung des Hintergrundes inklusive dem restlichen Gewebe wie Blutgefäße, Bindegewebe, Artefakte und Fett zeigte bei beiden Gruppen einen hohen, bzw. sehr hohen signifikanten Unterschied über den Zeitverlauf hinweg (*Gruppe 1* $p < 0,001$, *Gruppe 2* $p=0,003$). Der Tenotomiezeitpunkt verglichen mit der Kontrollseite zeigte eine fast identische Hintergrundmenge in *Gruppe 1*. Es erfolgte eine Zunahme über die Implantation bis zum Refixationszeitpunkt. Danach nahm der Anteil an Hintergrund bis zur Euthanasie ab. Der Refixationszeitpunkt zeigte signifikante Unterschiede zu allen anderen Zeitpunkten (Tenotomie $p < 0,001$, Implantation $p=0,002$, Euthanasie $p=0,021$, Kontrollseite $p < 0,001$).

In *Gruppe 2* war die Kontrollseite zu allen anderen Zeitpunkten signifikant unterschiedlich

(Tenotomie $p=0,028$; Implantation $p=0,032$; Euthanasie $p=0,012$), während sich die Menge des Hintergrunds auf der operierten Seite kaum veränderte.

Abb. XX

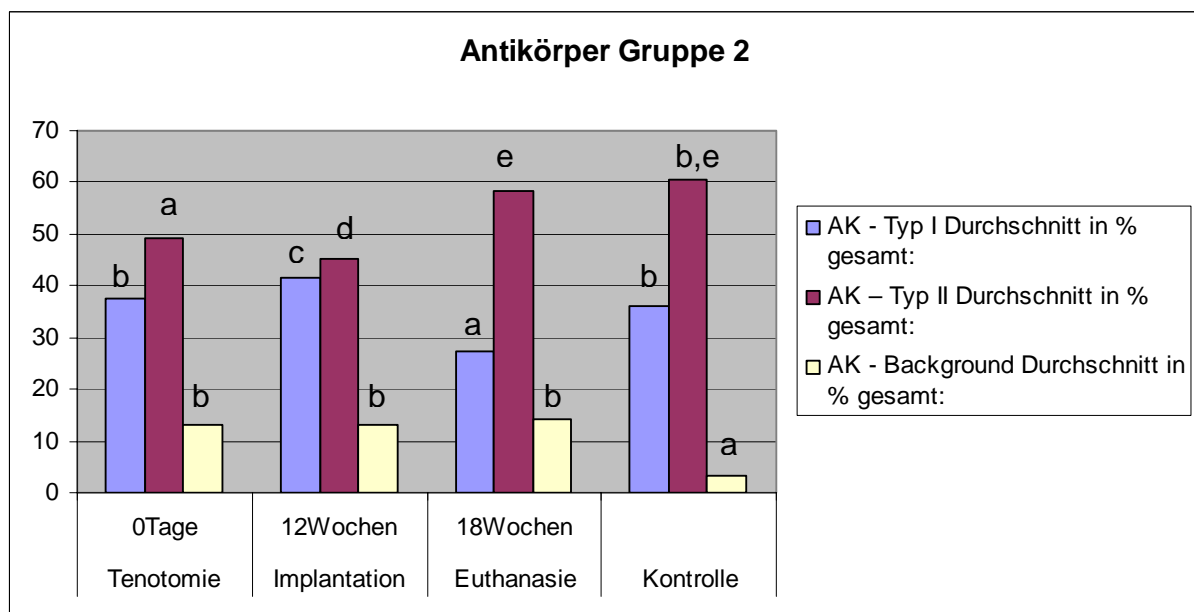
a)



a-b bedeutet signifikante Unterschiede ($p<0,05$)

a-c bedeutet hochsignifikante Unterschiede ($p<0,001$)

b)



a-b; d-e bedeutet signifikante Unterschiede ($p<0,05$)

a-c bedeutet hochsignifikante Unterschiede ($p<0,001$)

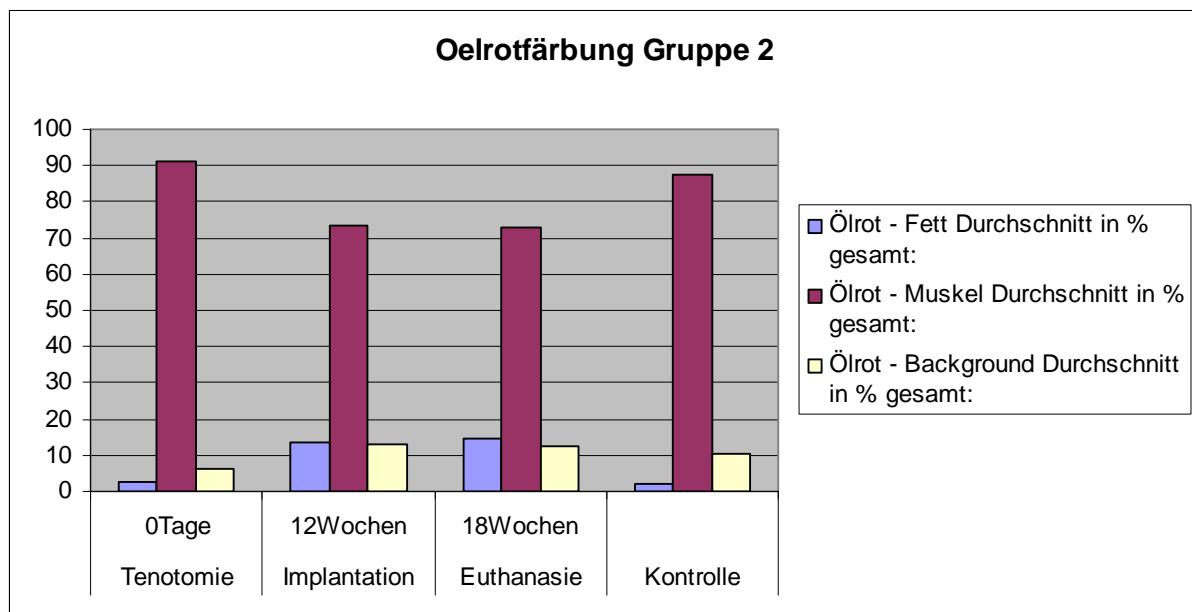
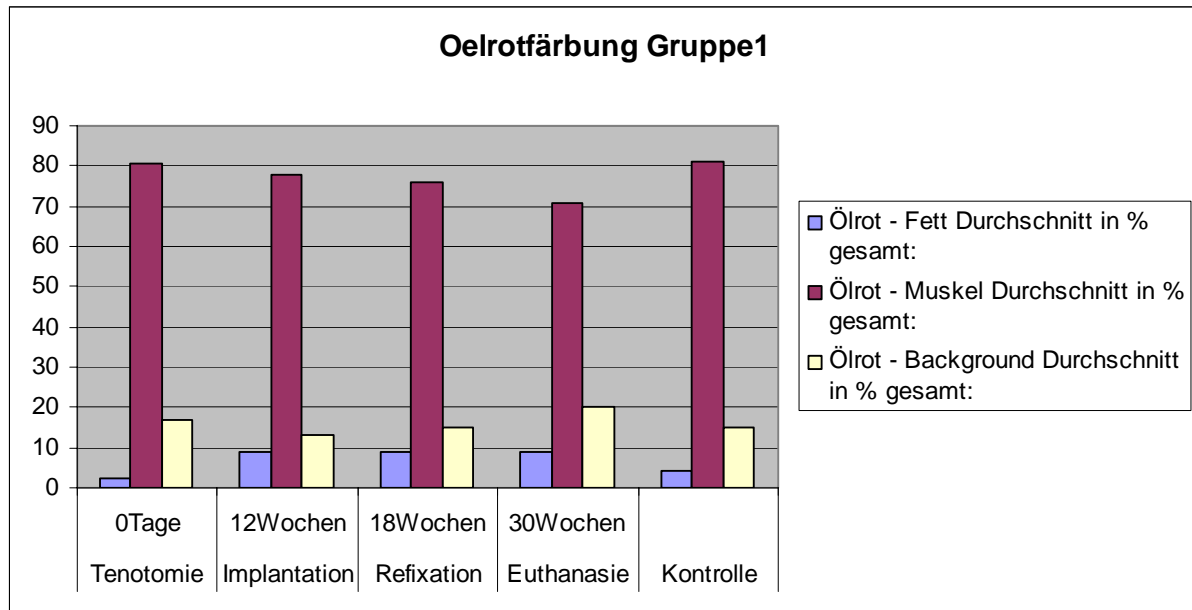
6.3.3 Ölrotfärbung

In der Messung des Fettanteils (rot) zeigte sich über den Zeitraum hinweg in *Gruppe 1* ein hoher signifikanter Unterschied ($p=0,048$, $\text{Power}=0,682$). Bei der Messung der Durchschnittswerte zum Zeitpunkt der Tenotomie lag der Fettgehalt tiefer als derjenige der Kontrollseite. In dieser Gruppe variierte die Standardabweichung stark. Beim Vergleich der einzelnen Zeitpunkte wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden. Das gleiche galt im Vergleich der einzelnen Zeitpunkte der *Gruppe 2*. Dort zeigte sich ein ähnliches Bild verglichen zur *Gruppe 1*, wobei hier die durchschnittliche Fettmenge der Kontrollseite geringer war, als zum Tenotomiezeitpunkt. Zum Zeitpunkt der Implantation und der Euthanasie stieg der Fettgehalt in *beiden Gruppen* an. Bei Betrachtung des gesamten Fettanteils in *Gruppe 2* zu den verschiedenen Zeitpunkten, zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,015$, $\text{Power}=0,815$) (Abb. XX, S. 36).

Bei der Durchschnittsmessung der gesamten Muskelfasermenge wurden in *beiden Gruppen* über die verschiedenen Zeitpunkte keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Es lässt sich aber ab dem Zeitpunkt der Tenotomie ein Rückgang der Muskeln sehen, wobei in *Gruppe 1* die Kontrollseite den gleichen Wert wie die Tenotomiegruppe hat. In der *Gruppe 2* (den Schafen mit Komplikationen) war dies nicht der Fall. Dort lag die Anzahl der Muskelfasern zum Zeitpunkt der Tenotomie höher als zum Zeitpunkt der Euthanasie an der nicht operierten Kontrollseite.

Bei der Hintergrundmessung traten in *beiden Gruppen* keine signifikanten Unterschiede auf. In der Tendenz wurde der Hintergrund von der Tenotomie ausgehend immer etwas mehr bis zur Euthanasie, wobei die Standardabweichung auch hier sehr variierte. Beim Vergleich der *beiden Gruppen* fällt auf, dass die Kontrollseite der verfrüht euthanasierten Schafe deutlich höher ist als die der Tenotomieseite.

Abb. XX



6.3.4 Faserdurchschnittsmessung

Die Messung des Durchmessers der *Typ I Fasern* in Gruppe 1 zeigte, dass die Größe der Fasern bei den einzelnen Schafen individuell unterschiedlich ist (z.B. Tenotomie: 32µm- 74µm). In der statistischen Auswertung der Durchmesser zu den verschiedenen Zeitpunkten ohne Berücksichtigung der einzelnen Schafe trat ein hoher signifikanter Unterschied ($p=0,015$; Power=0,825) auf (Tenotomie: Ø53,32µm; Implantation: Ø59,12µm; Refixation: Ø52,95µm; Euthanasie: Ø49,42µm). Wenn die Durchmesser unter Berücksichtigung der einzelnen Schafe

zu den verschiedenen Zeitpunkten beurteilt wurden, zeigte sich insgesamt ein hoch signifikantes Ergebnis ($p < 0,001$, Power=1,000). In Gruppe 2 war der Haupteffekt der verschiedenen Zeitpunkte signifikant ($p = 0,039$; Power=0,675). Die Interaktion zwischen den Zeitpunkten und den einzelnen Schafen war ebenfalls hochsignifikant ($p < 0,001$; Power=1,0). In beiden Gruppen zeigte sich nach einem leichten Anstieg der Durchmesser nach der Tenotomie bis zur Implantation, dass die Faserdurchmesser bis zum Zeitpunkt der Euthanasie abnahmen.

Unterschiede der Durchmesser der Typ I Fasern traten in *Gruppe 1 und 2* zwischen den einzelnen Zeitpunkten wie folgt auf (signifikant wenn $p < 0,05$):

Tabelle 4:

	Implantation	Refixation	Euthanasie	Kontrolle
Tenotomie	$p = 0,009$	$p = 1,000$	$p = 0,185$	$p < 0,001$
Implantation		$p = 0,004$	$p = 0,004$	$p = 0,004$
Refixation			$p = 0,276$	$p < 0,001$
Euthanasie				$p < 0,001$

Gruppe 2:

Tabelle 5:

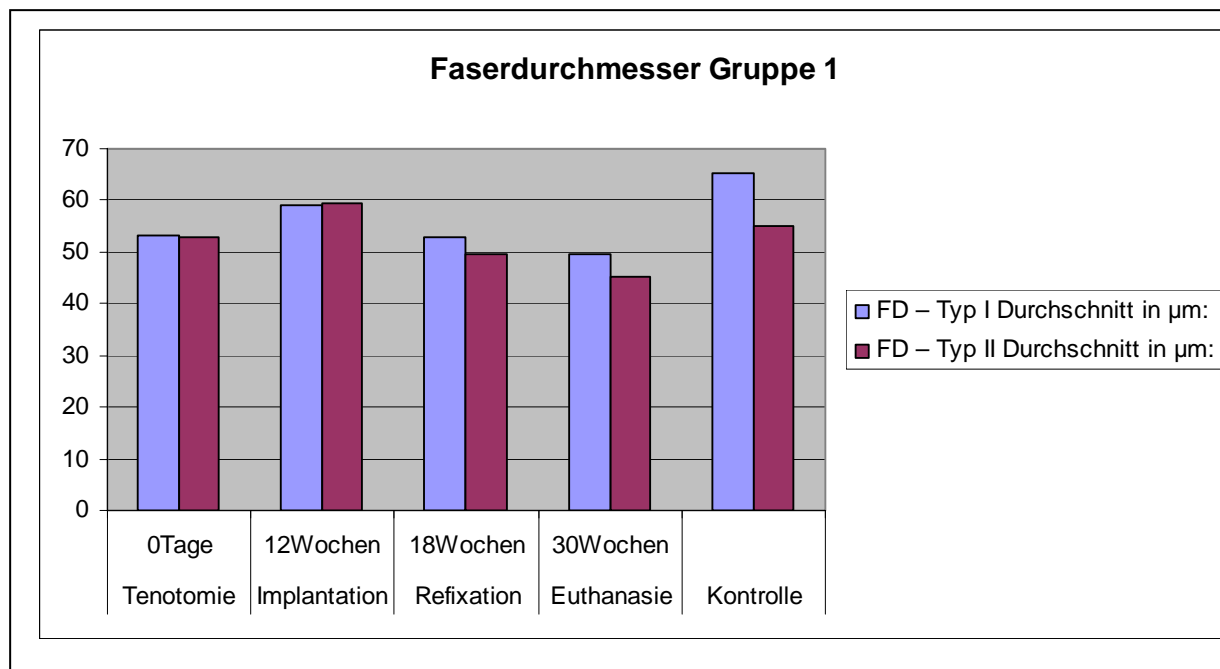
	Implantation	Euthanasie	Kontrolle
Tenotomie	$p = 0,202$	$p < 0,001$	$p = 0,024$
Implantation		$p < 0,001$	$p < 0,001$
Euthanasie			$p = 0,060$

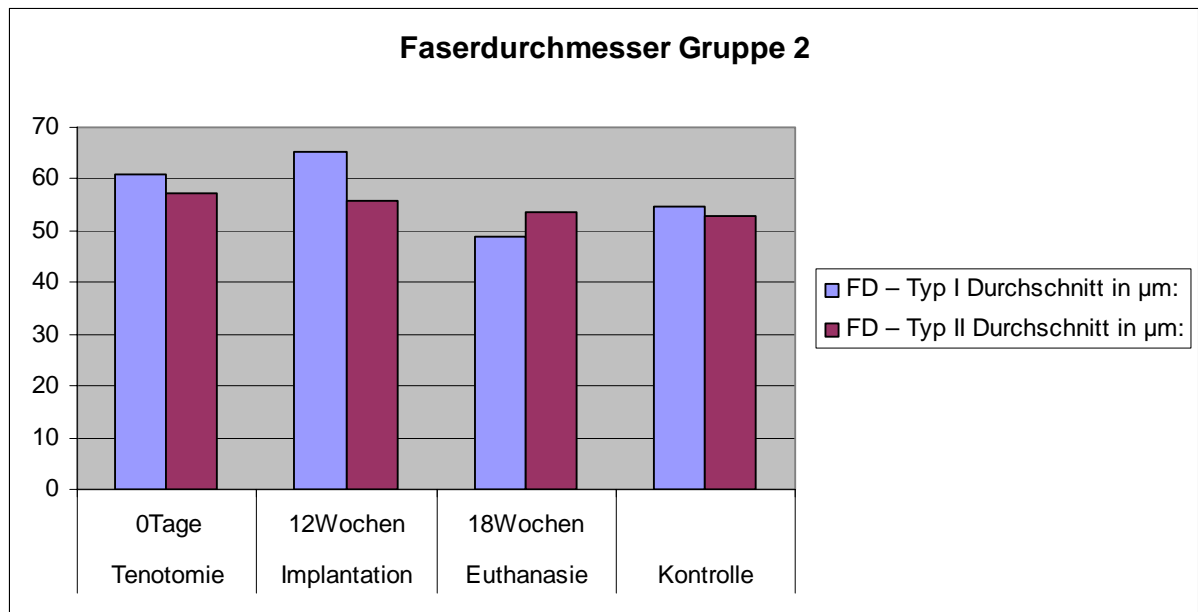
In *Gruppe 1* stieg der Durchmesser der Typ II Fasern von der Tenotomie zur Implantation an, um dann tendenziell abzunehmen. Bei dem Vergleich ohne Berücksichtigung der einzelnen Schafe, trat ein signifikanter Unterschied ($p = 0,019$, Power=0,796) auf. Bei Berücksichtigung der Zeitpunkte mit den einzelnen Schafen war ein sehr hoher signifikanter Unterschied ($p < 0,001$, Power=1,000) zu sehen. In *Gruppe 2* ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Im Durchschnitt erhöhte sich der Durchmesser der Typ II Fasern von der Tenotomie zur Implantation, um dann tendenziell wieder abzufallen.

Unterschiede der Durchmesser der Typ II Fasern in *Gruppe 1* traten zwischen den einzelnen Zeitpunkten wie folgt auf (signifikant wenn $p < 0,05$):

Tabelle 6:

	Implantation	Refixation	Euthanasie	Kontrolle
Tenotomie	$p < 0,001$	$p = 0,183$	$p < 0,001$	$p = 0,766$
Implantation		$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p = 0,025$
Refixation			$p = 0,051$	$p = 0,006$
Euthanasie				$p < 0,001$





In Gruppe 2 traten keine signifikanten Unterschiede auf.

Tabelle 7:

Gruppe 1: Übersicht der Werte für Schaf 2201, 2203, 2204, 2207, 2208, 2209, 2211, 2212, angegeben ist der Durchschnitt in Prozent gesamt und die Standardabweichungen

	Tenotomie 0Tage	Implantation 12Wochen	Refixation 18Wochen	Euthanasie 30Wochen	Kontrolle(30 Wochen)
AK – Typ I	32,43 ±4,70	34,09 ±7,45	31,73 ±5,74	30,18 ±8,30	32,90 ±9,72
AK – Typ II	60,79 ±6,61	56,97 ±8,38	51,04 ±9,98	59,40 ±10,43	59,51 ±12,75
AK - Back- ground	6,78 ±5,37	8,93 ±6,01	17,23 ±9,26	10,42 ±6,36	7,59 ±6,21
Ölrot - Fett	2,24 ±2,14	9,09 ±8,91	9,00 ±4,52	9,05 ±6,49	4,06 ±4,00
Ölrot - Muskel	80,75 ±12,63	77,90 ±15,29	75,97 ±14,58	70,79 ±21,82	80,98 ±7,13
Ölrot - Background	17,02 ±11,63	13,02 ±10,46	15,03 ±11,88	20,17 ±20,22	14,96 ±8,27
FD – Typ I	53,32 ±14,98	59,10 ±10,04	52,96 ±12,16	49,42 ±12,85	65,26 ±14,79
FD – Typ II	53,01 ±13,18	59,51 ±9,80	49,56 ±7,62	45,31 ±10,22	54,88 ±12,93

Legende:

- FD: Faserdurchmesser
- AK Antikörperfärbung
- Ölrot Ölrotfärbung

Tabelle 8: Übersicht der Werte für Gruppe 2: Schaf 2202, 2205, 2206, 2210 (Euthanasie vor Refixation); angegeben ist der Durchschnitt in Prozent gesamt und die Standardabweichungen

	Tenotomie 0 Tage	Implantation 12 Wochen	Euthanasie 18 Wochen	Kontrolle 18 Wochen
AK – Typ I	37,5347 ±8,56	41,5610 ±5,44	27,2925 ±6,70	36,1123 ±6,32
AK – Typ II	49,2130 ±9,09	45,3316 ±11,14	58,3747 ±6,62	60,6080 ±8,54
AK - Back-ground	13,2522 ±8,27	13,1074 ±8,90	14,3328 8,93	3,2797 ±3,51
Ölrot - Fett	2,5151 ±0,90	13,4314 ±5,54	14,8007 ±10,64	1,8720 ±1,11
Ölrot - Muskel	91,1785 ±7,24	73,6137 ±10,51	72,7256 ±10,76	87,5921 ±15,48
Ölrot - Back-ground	6,3065 ±6,95	12,9549 ±11,48	12,4738 ±14,17	10,5359 ±16,41
FD – Typ I	60,8885 ±16,70	65,2665 ±9,90	48,9953 ±8,06	54,5685 ±7,41
FD – Typ II	57,3885 ±12,79	55,9443 ±8,18	53,7048 ±9,36	52,9820 ±10,12

Legende:

- FD: Faserdurchmesser
- AK Antikörperfärbung
- Ölrot Ölrotfärbung

7 Diskussion

Mit der vorliegenden Studie wurde eine neue Operations- und Muskelregenerationsmethode für humane Rotatorenmanschettenrupturen beurteilt, in der die nach chronischen Rupturen entstandene Muskelatrophie und fettige Degeneration teilweise gestoppt oder regeneriert werden konnte. Die von Mayer et al. ermittelten Ergebnisse in Bezug auf die stärkste Degeneration der Typ I Fasern konnte bei chronischen Rupturen auch im Schaf bestätigt werden. Da wir in der Unterscheidung der Typ II A und Typ II B nicht erfolgreich waren, kann nur eine Aussage über die Degeneration der Typ II Fasern allgemein erfolgen. Diese sind zwar auch degeneriert, aber nicht in dem Maße wie die Typ I Fasern. Trotzdem müssen die Ergebnisse etwas kritisch betrachtet werden, da durch die sehr anspruchsvolle Operationstechnik eine relativ hohe Komplikationsrate zu verzeichnen war.

7.1 Versuchsmodell

Zur Durchführung der Studie wurden 12 (6 weibliche und 6 männlich-kastrierte) 2-3 Jahre alte Schafe ausgewählt. Die Tiere waren adult und phylogenetisch hoch-stehende Tiere, damit das Modell vergleichend zum Menschen angewendet werden konnte [37]. Wichtig war es, adulte Tiere zu nutzen, da die Regenerationsfähigkeit der noch im Wachstum befindlichen Tiere deutlich höher ist [37] und die Rotatorenmanschettenrupturen vermehrt bei älteren Menschen auftritt. Das Körpergewicht und die Muskelphysiologie des Schafes sind mit dem Menschen vergleichbar, zusätzlich sind Schafe relativ kostengünstig. Das in den vorausgegangenen Studien von Mayer et al. und Gerber et al. beschriebene Versuchsmodell wurde auch hier benutzt, um Vergleiche zwischen den verschiedenen Studien ziehen zu können [2].

Die Neuentwicklung des Dehnapparates wurde auf dem Hintergrund der Erfahrungen mit dem Operationsmodell nach Ilizarov ausgeführt. Ebenso entstand die Drehgeschwindigkeit von 1mm pro Tag [30, 31]. Da es sich um ein vollständig neues Verfahren im Muskel handelte und keine direkten Vergleiche vorlagen, war die Beurteilung des Versuchsaufbaues schwierig. Die hohe Infektionsgefahr war, wie auch bei den Knochen-Ilizarov-Modellen, gegeben [31] und stellte auch im Versuch das größte Problem dar. Durch diese Komplikationen mussten 4 Tiere frühzeitig eingeschläfert werden. Das Hauptproblem lag sicher darin, dass der Draht des Dehnungsapparates eine Austrittsstelle an der Haut aufwies und dies an einer relativ bewegten Stelle. Diese Beweglichkeit begünstigte die ohnehin schon hohe Infektionsgefahr. Bei dem in diesem Versuch verwendeten Dehnapparat handelte es sich um einen Prototypen, der sicher stark verbesserungswürdig ist. Wünschenswert wäre ein Apparat, der sich

durch elektronische Steuerung täglich verlängern ließe und damit eine Austrittspforte durch die Haut verhindert werden könnte.

7.2 Operationen und Verlauf

Die Tenotomie verlief bei allen Tieren komplikationslos. Die Schwierigkeiten während der Implantation des Dehnapparates beruhten meist auf der Freipräparation des Chips mit anhängender Sehne. Diese waren unterschiedlich weit retrahiert und waren trotz Penrosedrain teilweise mit ihrer Umgebung verwachsen oder hatten Neosehnen gebildet. Trotz der doch individuell gewinkelten Spina Scapulae der einzelnen Tiere erfolgte die Fixation des Spanners weitgehend problemlos. Das war größtenteils der Befestigung mit Verriegelungsschrauben zu verdanken.

Die Komplikationen während der Zeit des Dehnens waren teilweise einkalkuliert, da an Ilizarovmodellen eine Infektionsrate bis zu 50% beobachtet wurde [31]. Der Draht, der von der Haut nach innen an die Spina Scapulae führte, besaß die Wirkung eines Doctes und an diesem konnte die Infektion der äußeren Haut, die durch ständige Irritationen und das Leben in Stall entstanden sind, sich nach unten zum Dehnapparat hin ausdehnen. Zu Beginn der Studie hatte der Dehnapparat eine Schwachstelle am Übergang von der Platte zum Draht, der nach außen führte (Abb. 1-3). Deshalb wurde bei den weiteren Apparaten ein Kardangelenk an diese Stelle gesetzt (siehe Abb. 1-3). Dies sollte den Druck, der auf den Draht bei der Bewegung der Schulter des Schafes im Laufen entstand, abfangen. Das funktionierte auch gut, da es zu keinem weiteren Bruch des Drahtes mehr kam.

Durch die Infektion war das Allgemeinbefinden der Tiere teilweise vermindert. Durch Fieber und Schmerzen lagen die Tiere häufiger, fraßen tageweise schlechter und standen unter langwieriger Antibiose und Antiphlogese während der Infektionszeit. Eine Beeinflussung der Ergebnisse kann deshalb nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Die Schafe 2202, 2205, 2206, 2210 wurden auf Grund der Infektion nicht reinseriert, sondern frühzeitig euthanasiert. Die Schrauben des Dehnapparates waren bei diesen Tieren meist vollständig durch die Infektion gelockert. Der Infektion ist es auch zuzuschreiben, dass die Sehne/Chip durch die Entzündung brüchig wurde, die Sehne nicht mehr an dem Dehnapparat fixiert und dem Druck des Dehnens nicht mehr gewachsen war. Bei den restlichen Tieren wurde die Sehne an ihrem Insertionspunkt refixiert, was ohne große Probleme funktionierte. Durch die relativ starke Fibronisierung der Umgebung entstand kein großer Zug mehr auf die Reinsertionsstelle, dies erleichterte die Heilung. Die 14-tägigen CT-Kontrollen verliefen ohne Probleme.

Die 6-wöchige Ruhephase in den Netzen tolerierten die Tiere relativ gut (Abb. 16, 17). Das Schaf 2204 bekam im Hängesystem eine Entzündung an der Operationswunde direkt über der Schraube, mit der die Sehne am Knochen befestigt wurde. Diese konnten wir aber nach längerer Behandlung durch antibiotische Behandlung und Eröffnen der Naht an dieser Stelle zur Abheilung bringen. Eine Ursache konnte nicht sicher eruiert werden. Die wahrscheinlichste Möglichkeit wäre eine bereits bestehende Infektion vor der Refixation, welche durch das 4-malige Öffnen an der gleichen Operationswunde sicherlich begünstigt wurde. Ein weiterer Punkt war der Infektionsdruck in einem Stall bzw. einer mit Stroh gefüllten Boxe, der nicht ganz vernachlässigt werden kann. Da sich dieser Versuch jedoch über mehrere Wochen hin-zog, konnte auf die Stroheinstreu nicht verzichtet werden, ohne das Wohlbefinden der Schafe nicht erheblich zu reduzieren.

In der folgenden 6-wöchigen Periode der freien Bewegung traten keine weiteren Komplikationen mehr auf. Nach Entfernen des Verbandes lahmten die Tiere noch einige Tage, was sowohl der verminderten Klauenhornqualität wie veränderter Sehnen- und Bänderqualität zugeschrieben wurde.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Komplikationen zum größten Teil auf Infektionen durch den aus der Haut herausstehenden Draht zurückzuführen sind.

7.3 Probenaufbereitung, Färbungen und Auswertung

Die Muskelbiopsien wurden alle 4-6cm oberhalb des Akromions aus dem M. infraspinatus entnommen, wobei in den nachfolgenden Operationen noch die Biopsiestelle der vorausgegangenen durch einen nicht resorbierbaren Faden gekennzeichnet war. Somit wurde gewährleistet, dass die Biopsie an ungefähr der gleichen Muskelregion, jedoch nicht an der gleichen Stelle entnommen wurde. Dies konnte aber von Tier zu Tier etwas variieren. Es ist histologisch nicht auszuschließen, dass Fasern des M. deltoideus mit in den Anschnitten zu sehen waren. Ebenfalls versuchten wir die Proben schnellst möglich, wie oben erklärt, zu frieren, um die Gefrierartefakte so gering als möglich zu halten. Die Proben wurden direkt nach der Operation aus dem Flüssigstickstoff in einen -80°C Gefrierschrank gebracht, um einem möglichen Auftauen vorzubeugen.

Die Anfertigung der Gefrierschnitte, der HE- und Ölrotfärbung liefen in unserem Labor nach standardisierten Protokollen ab. Dabei bestand jedoch die Schwierigkeit, die Proben so zu schneiden, dass die Fasern immer gut im Queranschnitt getroffen wurden. Da aber immer mindestens 10 Messungen pro Probe durchgeführt wurden, dürfte der errechnete Wert dem Durchschnitt entsprochen haben.

Die Etablierung einer ATP-ase Färbung [38-41] mit der wir Typ IIA und Typ IIB – Fasern beim Schaf unterscheiden konnten, ist leider nicht gelungen. Aus einem Vergleich der Klassifizierung von Brooke und Kaiser et al. [42] und von Guth und Samantha et al. (1969,1970) geht hervor, dass die Differenzierung in die verschiedenen Subtypen nur im Zusammenhang mit der dazu verwendeten Reaktionsweise (verschiedene pH-Werte) betrachtet werden sollte [43]. Nach dem ergebnislosen Versuch mit der Methode nach Brooke und Kaiser et al., versuchten wir diese Unterscheidung mit einer Antikörperfärbung zu lösen. Mit einer Doppelfärbung konnten die Typ I zu Typ II Fasern sehr schön unterschieden werden. Leider war es uns jedoch auch hier nicht möglich eine weitere Differenzierung der Typ II Fasern zu erreichen.

Daraus wurde geschlossen, dass es am wahrscheinlichsten war, dass der ausgewiesene Typ IIB Antikörper eventuell nicht spezifisch nur auf Typ IIB sondern auch Kreuzreaktionen mit Typ IIA beim Schaf zeigte. Der Antikörper war für Maus, Kaninchen und Mensch spezifisch ausgeschrieben. Ebenfalls besteht die Möglichkeit, dass es gar keine Typ IIA und Typ IIB Fasern an dieser Lokalisation des Muskels gab, oder dass es in dem Alter bei Schafen keine Faserunterscheidung mehr gibt [9]. Wir konnten deshalb leider die Ergebnisse von Peinado et al. mit unserer Methode nicht bestätigen. Auch Biopsien vom M. tibialis cran. und M. longissimus dorsalis konnten mit der ATP-ase- und Antikörperfärbung keine Typ II Differenzierung nachweisen. Somit mussten wir uns gezwungenermaßen auf die Auswertung der Typ I und Typ II Fasern im Allgemeinen beschränken.

7.4 Histologie

7.4.1 Antikörperfärbung

7.4.1.1 Typ I

In Gruppe 1 zeigte sich zum Zeitpunkt der Tenotomie und der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt der Euthanasie ein sehr ähnliches Bild. Dies war zu erwarten, da in der Gruppe zum Tenotomiezeitpunkt noch der gesunde Muskel vorhanden war, ebenso wie in der Kontrollseite zum Zeitpunkt der Euthanasie. Damit konnten diese beiden Gruppen als Vergleichstiere genutzt werden. Der Trend der Abnahme von Typ I Fasern über die verschiedenen Zeiträume an der operierten Seite, bestätigen die in der Literatur bereits beschriebenen Ergebnisse. Es kam auch nach der Implantation und der kontinuierlichen Dehnung zu keiner signifikant erkennbaren Regeneration der Typ I Fasern.

In der Gruppe 2 war der Abwärtstrend der Typ I Fasern sehr deutlich zu sehen, wobei es zu

einem leichten Anstieg der Fasern zwischen dem Zeitpunkt der Tenotomie und der Implantation kam. Das könnte eventuell mit den Entnahmestellen am Muskel zu tun haben. Diese wurden zwar augenscheinlich immer direkt neben der letzten Stelle entnommen, aber es ist noch nicht geklärt, ob die Fasern im Muskel überall gleich verteilt sind. Ödembildung in den Fasern wäre auch ein Ansatz um dieses Phänomen zu erklären.

Wenn die beiden Gruppen untereinander verglichen werden, könnte die Vermutung aufkommen, dass durch das kontinuierliche Dehnen ohne größere Komplikationen der Rückgang der Fasern verzögert und somit nach der Refixation eine bessere Regeneration der Typ I Fasern erzielt werden könnte. Diese Vermutung lässt sich aus dem Rückgang der Fasern in Prozent zwischen den einzelnen Zeitpunkten erhärten. (Rückgang der Fasern in Gruppe 1 von dem Zeitpunkt der Tenotomie zu dem Zeitpunkt der Refixation: ca. 2%; in Gruppe 2 vom Tenotomiezeitpunkt zum Euthanasiezeitpunkt, also in 18 Wochen ca. 10%; siehe Tabelle Gruppe 1/2 in Resultate Seite 39/40). Die Tiere in Gruppe 2 wurden zwar auch gedehnt, hatten aber im Laufe der Dehnung größere Komplikationsraten mit Infektionen und Probleme mit dem Dehnapparat. Deshalb wurden sie auch nicht refixiert und es fand vor der Euthanasie wegen der Komplikationen auch keine Dehnung mehr statt.

Die Abnahme ist auch mit der Veränderung des Faserwinkels und der danach entstehenden Fetteinlagerung zu erklären [1].

7.4.1.2 Typ II

Der für die wenigen Tiere relativ hohe signifikante Unterschied ($p=0,007$) in Gruppe 1 und 2 ($p=0,000$) verdeutlichen die guten Ergebnisse dieser Messung.

Eine Abnahme der Typ II Fasern in Gruppe 1 lief über die Implantation zur Refixation ab (signifikanter Unterschied Tenotomie zu Refixation $p=0,023$). Die Fasern scheinen sich jedoch in der Zeit nach der Refixation wieder zu regenerieren, da nach der Euthanasie (30 Wochen nach Tenotomie) die Fasern wieder fast auf den Ausgangspunkt bei der Tenotomie zurückgekehrt waren.

Ganz im Gegensatz dazu steht die Gruppe 2. Dort nahmen die Typ II Fasern während der Dehnphase stark zu. Auffällig ist, dass die Typ II Fasern genau im gleichen Maß zu- wie die Typ I Fasern abnahmen. Dieses Phänomen zeigte sich über den Zeitpunkt der Implantation und der Euthanasie. Hier könnte sogar vermutet werden, dass die Fasern Typ I in die Fasern Typ II umgebaut wurden. Am wahrscheinlichsten ist jedoch, dass diese unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Gruppen sich mit der schlechten bis nicht vorhandenen Dehnung der Fasern in der 2. Gruppe erklären lassen. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, die Regenera-

tion der Typ II Fasern, oder eine starke Ödematisierung der Fasern. Diese Wassereinlagerung würde dann in der Messung fälschlich als Faservermehrung dargestellt werden.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen könnten vielleicht so erklärt werden, dass in Gruppe 1 durch die kontinuierliche Dehnung keine Umbaumaßnahmen der Fasern vorgenommen wurden oder dass der Körper durch die Dehnung nicht das „Signal“ zu Umbaumaßnahmen gibt. Der Muskel verhält sich so, als ob dort noch eine Regeneration stattfinden könnte. Es gäbe auch die Möglichkeit, dass die Typ I Fasern nicht so stark wie Typ II Fasern ödematisieren. Diese Theorien müssten jedoch mit weiteren Studien belegt werden, wobei der Anteil der Oedematisierung nicht ganz so leicht messbar sein würde.

7.4.1.3 Background

Der Hintergrund zeigt in beiden Gruppen einen sehr hohen signifikanten Unterschied (Gruppe 1 $p=0,003$; Gruppe 2 $p<0,001$), wobei die Ergebnisse der ersten Gruppe der ursprünglichen Hypothese entsprachen.

Zum Zeitpunkt der Tenotomie und Euthanasie sind die Messergebnisse der Muskelfaseranteile wieder sehr nah beieinander, womit man diese wieder als gute Kontrolle nutzen kann. Dieses besagt auch, dass die Kontrollseite keine massiven Veränderungen erfahren hat, durch stärkeres Liegen oder höhere Belastung.

Dort nimmt der Hintergrund, der Fettgewebe, Bindegewebe und Blutgefäße enthielt, nach der Tenotomie zu. Dort kommt es, wie in Mayer et al. beschrieben zu den besagten Veränderungen der Faserwinkelung und anschließender Fetteinlagerung ((Hoch)-Signifikanzen zu allen anderen Zeitpunkten). Diese Veränderungen schienen sich während der Dehnphase weiter zu verbreiten. Nach Refixation der Sehne nahm der Hintergrund in Gruppe 1 wieder deutlich ab, was die Vermutung nahe legt, dass Fett und Bindegewebe abgebaut und Fasern wieder aufgebaut wurden. Dieses würde die Ausgangsthese der Studie unterstützen. Andererseits darf auch nicht vergessen werden, dass durch die Dehnung die Fasern morphologisch dünner erscheinen können.

Dieses positive Ergebnis ist jedoch immer auch unter dem Aspekt zu betrachten, dass der Schnitt nicht immer an der gleichen Muskelregion genommen werden konnte. Somit könnte manchmal eine Region im Schnitt getroffen worden sein, die eventuell mehr Gefäße und Bindegewebe besessen hat, als eine andere Region des Muskels. Diese Variabilität könnte unter Umständen etwas das Ergebnis verfälschen.

Die Hintergrundmessung in Gruppe 2 zeigt ein eher ungewöhnliches Ergebnis. Der Tenotomiezeitpunkt und die Kontrollseite zum Euthanasiezeitpunkt haben völlig unterschiedliche

Ergebnisse. Die Kontrollseite hat einen viel geringeren Hintergrundanteil als der Muskel zum Tenotomiezeitpunkt. Dieses könnte so erklärt werden, dass diese Tiere an der operierten Seite häufiger Komplikationen (Infektionen mit Schmerzen) hatten und deshalb diese Gliedmaße weniger belasteten. Daraus könnte eine Mehrbelastung der anderen nicht operierten Gliedmaße stattgefunden haben, was den höheren Muskelgehalt bzw. den geringeren Hintergrund erklären würde. Das konnte jedoch bei den Anfärbungen mit Antikörpern nicht gezeigt werden. Um diese Theorie zu bestätigen oder auszuschließen, sollte man noch die Elektronenmikroskopischen Ergebnisse (z.B. Mitochondrienverteilung) hinzuziehen.

Ebenfalls ungewöhnlich war, dass der Hintergrund nach der Tenotomie bis zur Euthanasie nicht wesentlich zunahm, was ja bedeuten würde, dass es nicht zu einer Veränderung der Fasern mit Fetteinlagerung gekommen wäre. Zur Zeit kann für diesen Befund keine Erklärung gefunden werden.

7.4.2 Ölrotfärbung

7.4.2.1 Fettanteil

Der Fettanteil verhält sich in beiden Gruppen sehr ähnlich. In Beiden ist der Kontrollmuskel mit dem Muskel zum Zeitpunkt der Tenotomie zu vergleichen. Nach dem Durchtrennen der Sehne kommt es zu Einlagerungen von Fett in den Muskel, wie es in Mayer et al. beschrieben wurde (Signifikanz Gruppe 1 $p=0,048$ und Gruppe 2 $p=0,015$).

Während der Dehnphase kam es bei beiden Gruppen leider nicht, wie erhofft, zu einem klaren Rückgang des Fettanteils. Ebenfalls war auch kein Rückgang des Fettanteils nach der Refixation der Sehne in Gruppe 1 zu erkennen. Was jedoch auch auffällig war, der Muskel hatte nach der Implantation und Refixation der Sehne auch keine Fettzunahme mehr, wobei man dies auch als positiven Teilerfolg werten konnte. Der Muskel hatte eventuell auch schon während den 12 Wochen nach der Tenotomie seine maximale fettige Degeneration erreicht. Es könnte aber auch sein, dass das Verschwinden der Fettzellen bzw. der Aufbau der Muskelfasern einer längeren Regenerationszeit bedarf.

Eine weitere Beeinflussung des Fettgehaltes könnte als Ursache haben, dass die Schnitte nicht immer exakt an der gleichen Stelle des Muskels entnommen wurden und somit hatte man teilweise auch noch Faszie mit Faszienfett auf einigen Schnitten. Dieses Fett wurde bei der Auswahl des zu messenden Abschnitts soweit als möglich herausgenommen.

7.4.2.2 Muskelanteil

Auch hier waren die *beiden Gruppen* sehr ähnlich verteilt. Der Muskel zu Zeitpunkt der Tenotomie und der Kontrollseitenmuskel zu Zeitpunkt der Euthanasie waren wieder als Gesamtkontrolle oder Ausgangspunkt zu sehen. Die Abnahme der gesamten Muskulatur (alle Fasertypen) nach der Tenotomie war in beiden Gruppen sehr ähnlich. Nach der Implantation des Dehnapparates kam es zu einer weiteren sehr geringen Abnahme der Muskulatur. Dies zog sich bei Gruppe 1 nach Refixation der Sehne bis zur Euthanasie weiter. Diese Ergebnisse sprachen gegen eine Regeneration, es kam sogar zu einem weiteren Verlust von Muskelfasern nach der Dehnung, wobei man hier natürlich berücksichtigen musste, dass die Fasertypen nicht unterschieden wurden. Es könnte auch sein, dass durch die Dehnung die Fasern morphologisch dünner erschienen und der Fettanteil wie vorher beschrieben noch prominent war. Diese Ergebnisse könnten auch durch die Schnittauswahl stark beeinflusst sein. Die Schnitte füllten teilweise nicht das komplette Sichtfeld unter dem Mikroskop aus, wobei in den Schnitten teilweise größere Lücken entstanden waren, die dann zu dem Hintergrund hinzugezählt wurden. Dies könnte an der Färbung und/oder am Präparat gelegen haben, da es bei den Antikörperfärbungen nicht zu größeren Lücken gekommen war, liegt die Vermutung nahe, dass es ein Problem der Färbung war (Abb. 20, 21)

Dieses Ergebnis wurde auch durch die Auswertungen der Antikörperfärbungen der gleichen Muskeln nicht bestätigt. Ebenfalls traten in der Ölrotfärbung der Muskulatur keine signifikanten Unterschiede auf.

7.4.2.3 Background

Die Ergebnisse der Hintergrundmessung sind sehr schwierig zu interpretieren, wie schon in der Muskelmessung dieser Färbung erwähnt.

Es gab in beiden Gruppen keine klaren Tendenzen, die man interpretieren konnte, außer, dass es eine tendenzielle Zunahme des Hintergrundes nach der Tenotomie gab, was eventuell auf eine Zunahme des Bindegewebes schließen lässt. Das diese Schlüsse als kritisch anzusehen sind, zeigen auch die unterschiedlichen Ergebnisse des Hintergrunds zum Zeitpunkt der Tenotomie und die Kontrollseiten zum Zeitpunkt der Euthanasie.

7.4.3 Faserdurchmesser

7.4.3.1 Typ I und Typ II Fasern

Bei der Auswertung der Durchmesser waren in beiden Gruppen ebenfalls ähnliche Ergebnisse aufgetreten. Die Durchschnittsmessung der Fasern ergab keinen klar erkennbaren Trend in

den einzelnen Zeitpunkten. Es zeigte sich, dass jedes Tier einen sehr individuellen Faserdurchmesser besaß und dieser auch zwischen den verschiedenen Zeitpunkten sehr variabel war. Die sehr variierenden Standardabweichungen bestätigten dies. Ebenso könnte man vermuten, dass die Faserdurchmesser in einem Muskel nicht homogen waren, da die Durchmesser von ca. $32\mu\text{m}$ – $79\mu\text{m}$ variierten und es auch hier wiederum nicht immer von der exakt gleichen Stelle des Muskels entnommen wurde. Es wurde auch keine Unterscheidung der Durchmesser der Faser Typ I und II Fasern bemerkt. Somit kann als Resümee gelten, dass der Faserdurchmesser bei ausgewachsenen Schafen kein idealer Parameter für die Einschätzung der Muskelatrophie ist. Wenn dieser Parameter weiter hinzugezogen werden soll, müsste erst der ganze Muskel untersucht werden, um einen Einblick der Faserverteilung und deren Durchmesser allgemein zu bekommen. Dann könnte entschieden werden, ob dieser Parameter weiter verfolgt werden sollte.

8 Schlussfolgerungen und Zukunftsperspektiven

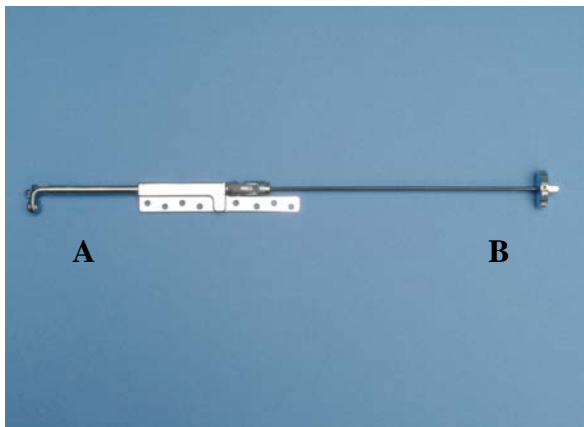
In der vorliegenden Studie wurde versucht, eine neue Operationsmethode bzw. Heilungsmethode für chronische Sehnenrisse der Rotatorenmanschette der Schulter beim Menschen zu finden. Mit einem neu entwickelten Dehnapparat, der eine kontinuierliche Sehnendehnung gewährleistete, sollte dieses gelingen.

Bei 8 von 12 Tieren konnte die Refixation der Sehne vorgenommen werden, was schon einen guten Teilerfolg bedeutete. Diese Sehnen rupturierten auch nach voller Belastung nicht wieder. Die Tiere erholten sich gut.

Histologisch konnte jedoch keine eindeutige Regeneration der atrophierten Muskeln während der Dehnphase gesehen werden. Was aber erkennbar war, dass es vor allem bei den Typ I Fasern während der Dehnung zu keiner weiteren Abnahme der Fasern gekommen war und die Typ II Fasern, die nach der Tenotomie bis zur Refixation abnahmen, sich nach der Refixation scheinbar sogar wieder regenerieren. Ebenfalls ein interessantes Ergebnis lag in Gruppe 2 vor, wo die Fasern Typ II nach dem Ausreißen der Sehne offenbar in Typ I umgebaut und unter kontinuierlichen Dehnung das Phänomen umgedreht wurde, indem die Typ II Fasern in dem Maße zu- wie die Typ I Fasern abnahmen.

Als Zukunftsperspektive sollte die Entwicklung eines Dehnapparates angestrebt werden, der nicht mehr die Haut penetriert, um die hohen Infektionskomplikationen zu vermindern. Weiterhin sollten die restlichen Komplikationen (Ausreißen des Chips, Reißen des Fadens, Probleme bei den Histologiefärbungen und Schnitten) optimiert werden. Ebenfalls sollte weiterhin versucht werden, die Faserunterscheidung der Typ II Fasern in A, B, C für eine nächste Studie zu erreichen. Dies könnte Aufschluss über Regelungen des Körpers zeigen, die nach chronischen Sehnenrissen im Muskel ablaufen (Umwandlung der Fasertypen). Ebenfalls von Vorteil wäre es die komplette Struktur des M. infraspinatus zu erforschen, um dann die vorhandenen Ergebnisse besser interpretieren zu können. Die Ergebnisse dieser Studie sind noch etwas vorsichtig zu sehen wegen etlicher Komplikationen, doch dienen sie als äusserst interessanter Ausgangspunkt für weitere Studien.

9 Abbildungsverzeichnis



A: Fixationspunkt der Sehne am Dehnapparat

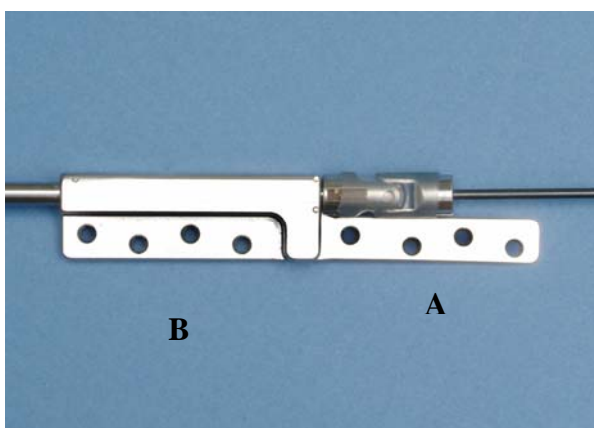
B: Austrittsstelle aus der Haut

Abb. 1 - 3 : Der Dehnapparat sorgt für die kontinuierliche tägliche Dehnung



A: Rad zum Drehen außerhalb der Haut

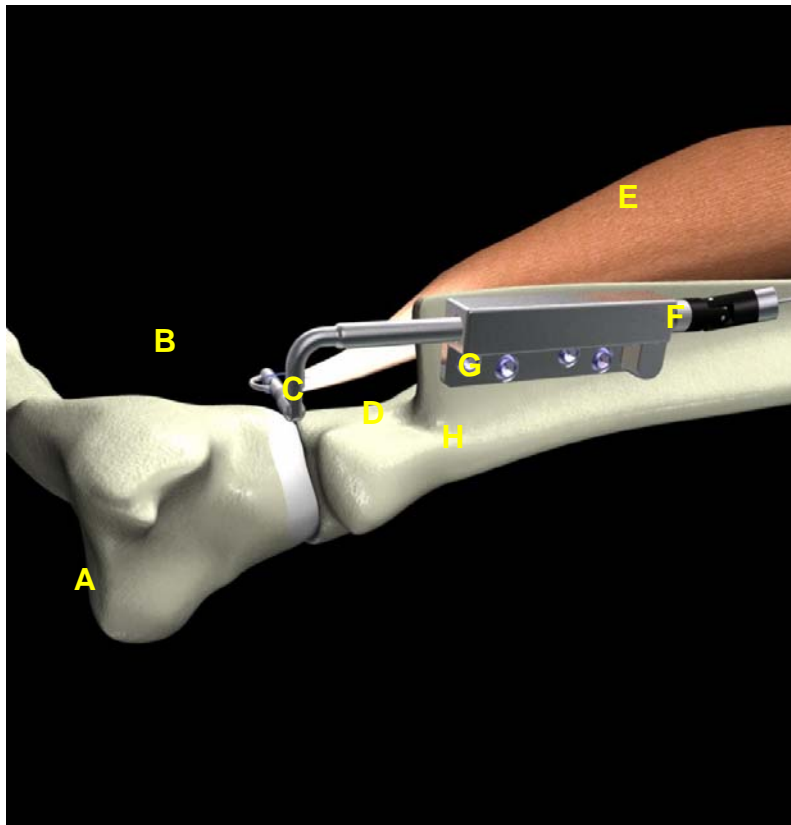
Abb. 2



A: Kardangelenk, um ein Abbrechen an dieser Stelle zu vermeiden und ein leichteres Drehen zu gewährleisten

B: Fixation der Platte an der Spina scapula mit Winkelstabilen Schrauben (passendes Gewinde in Löchern)

Abb. 3



A: Humerus

B: Fixation an der Öse des Dehnapparates

C: Sehne des M. infraspinatus

D: Spina Scapula

E: M. infraspinatus

F: Kardangelen

G: Fixation mit winkelstabilen Schrauben

H: Scapula

Abb. 4: Position des Dehnapparates an der Spina scapulae mit angehefteter Sehne

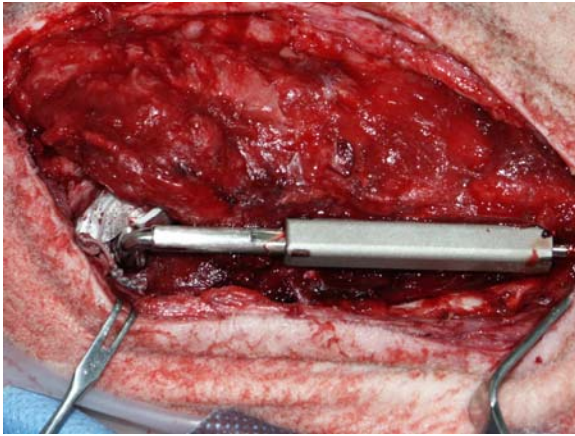


Abb. 5: Dehnapparatimplantation: Fixation an der Spina scapulae des rechten Schulterblattes

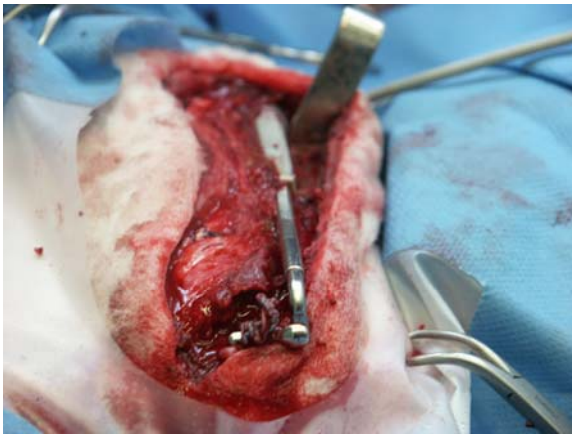


Abb. 6: Sehnenfixation am Querholm des Dehnapparates



Abb. 7: Kompletter Dehnapparat mit Austrittsstelle aus der Haut zum kontinuierlichen Dehnen der Sehne

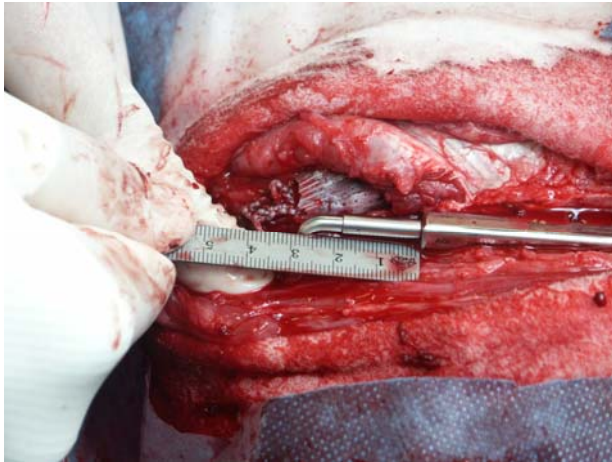


Abb. 8: Messung der Ausfahrlänge



Abb. 9: Muskelelastizitätsmessung



Abb. 10: Schutzsäckchen über den austretenden Draht



Abb. 11: Refixation der Sehne an der Insertionsstelle



Abb. 12: Schultern bei der Euthanasie mit Komplikationen



Abb. 13: Schulter mit Komplikationen nach Euthanasie



Abb. 14: Dehnapparat mit ihn umgebenden Abszess



Abb. 15: Penrosedrain mit ausgerissener Sehne

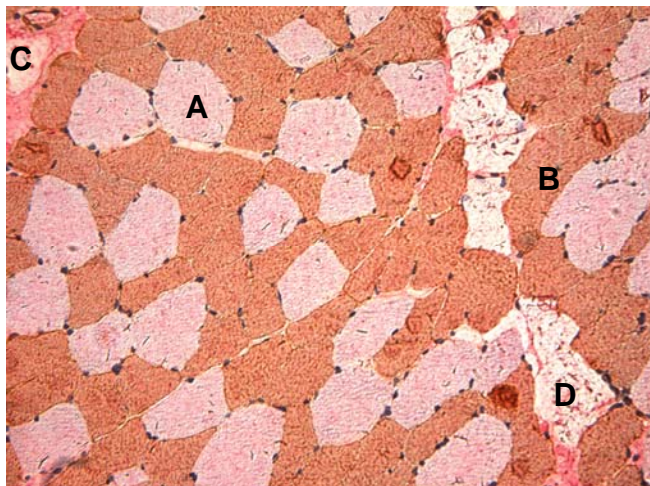


Abb. 16 und 17: Hängesystem nach Refixation der Sehne für 6 Wochen



Abb.: 17

Schaf 2203 (oben) und 2204 (unten) nach der Refixation der Sehne mit Schutzverbänden, inklusive Holzkugel unter der rechten Klaue zur Entlastung der Sehne des M. infaspinatus. Die Tiere tolerieren die Fixation im Netz gut.



A: Typ I Fasern

B: Typ II Fasern

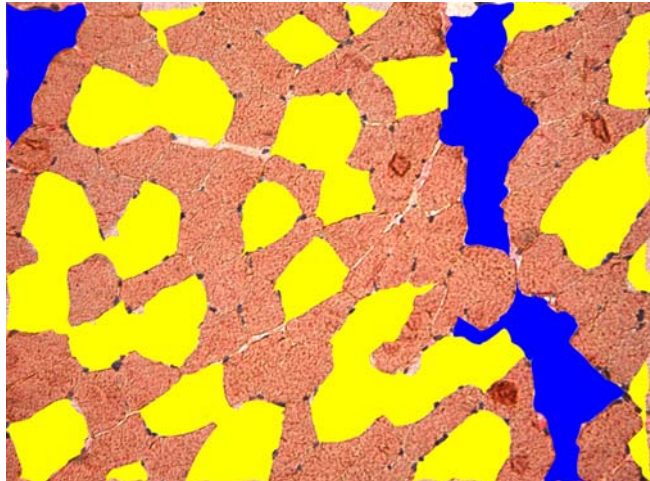
C: Blutgefäß

D: Fett

Kontrollseite zum Euthanasiezeitpunkt

Antikörperfärbung

Abb. 18: Antikörperfärbung Muskelfasertypen: Histologischeschnitt der Antikörperfärbung mit Typ I und Typ II Fasern

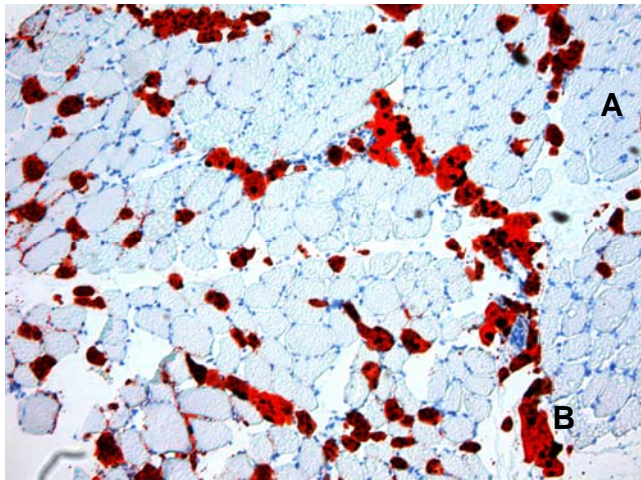


Gelb: Typ I Fasern

Braun: Typ II Fasern

Blau: Hintergrund (Fett, Bindegewebe, Blutgefäße)

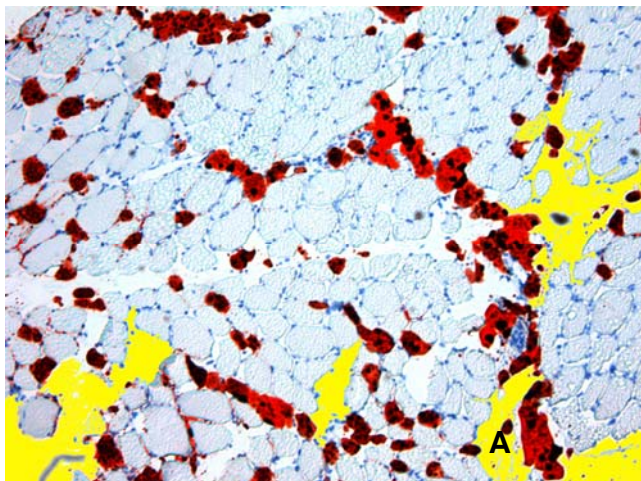
Abb. 19: Antikörperfärbung Muskelfasertypen: Histologischeschnitt der Antikörperfärbung mit Typ I und Typ II Fasern, Schnitt nach Anfärbung der Fasern mit Adobe Photoshop® für Messung mit Leica® Qwin



A: Muskelfasern
(Typ II und II)

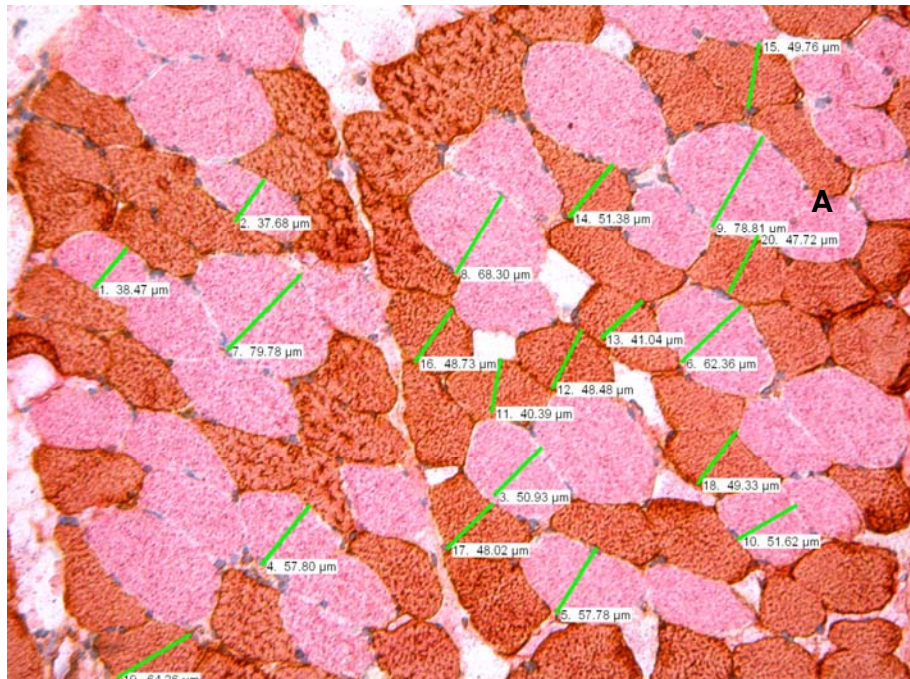
B: Fett

Abb. 20: Ölrotfärbung zur Messung des Fettanteils: Histologieschnitt (Ölrotfärbung). Operierte Schulter zum Euthanasiezeitpunkt.



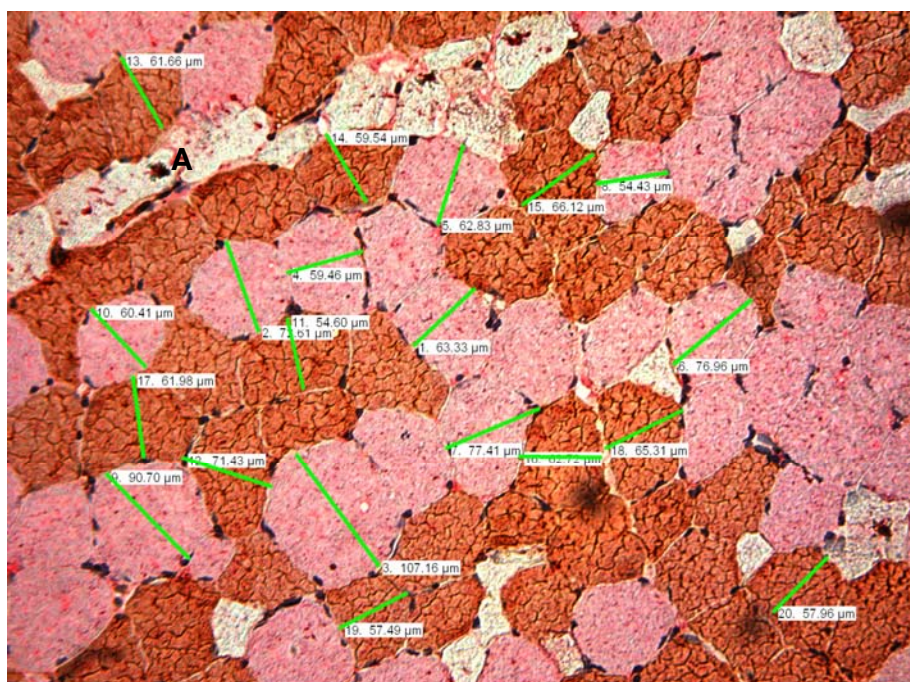
A: Hintergrund mit Blutgefä-
ßen, Bindegewebe und nicht
ausgefülltem Schnitt im Sicht-
feld

**Abb. 21: Histologieschnitt (Ölrotfärbung). Anfärbung des Schnittes mit Adobe Photo-
shop® zum Messen mit Leica® Qwin.**



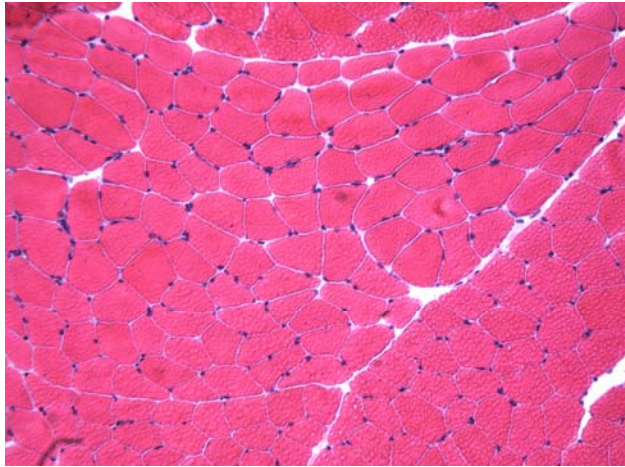
A: Durchmesser messung Typ I und II

Abb. 22 und 23: Messung der Durchmesser der Typ I- und Typ II Fasern in der Antikörperfärbung mit Leica IM1000®



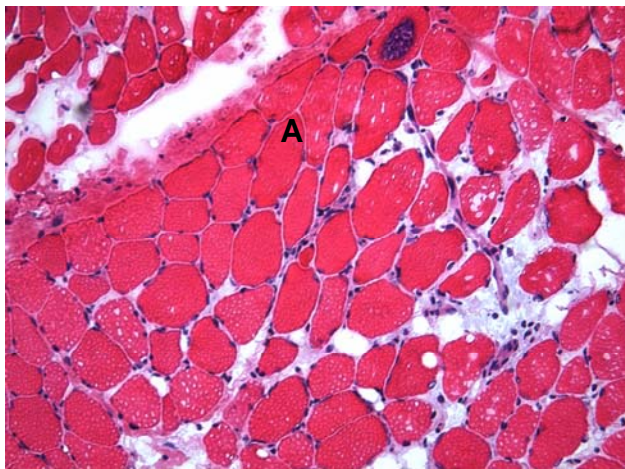
A: Durchmesser messung Typ I und II

Abb.: 23



Muskelfaserbündel (Typ I und Typ II)
mit randständigen Kernen

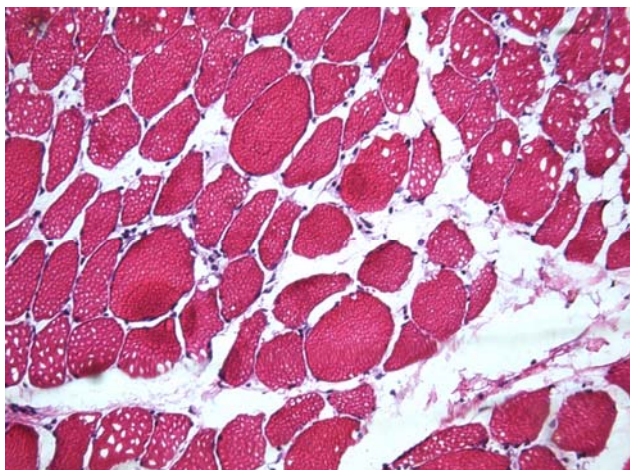
Abb. 24: H.E. Färbung zum Zeitpunkt der Tenotomie



Muskelfasern mit Einlagerung von Fettzellen

A: Sarkosporidienei

Abb. 25: H.E. Färbung zum Zeitpunkt der Implantation



höhere Fetteinlagerung auch zwischen den
Faserbündeln

Abb. 26: H.E. Färbung zum Zeitpunkt der Euthanasie

10 Literaturverzeichnis

1. Meyer, D.C., et al., *A pathomechanical concept explains muscle loss and fatty muscular changes following surgical tendon release*. J Orthop Res, 2004. **22**(5): p. 1004-7.
2. Gerber, C., et al., *Effect of tendon release and delayed repair on the structure of the muscles of the rotator cuff: an experimental study in sheep*. J Bone Joint Surg Am, 2004. **86-A**(9): p. 1973-82.
3. Engelhardt von, W. and G. Breves, *Physiologie der Haustiere*. 1.Edition ed. Vol. 7. 2000: Enke Verlag. 110-118.
4. Klinke, R. and S. Silbernagel, *Lehrbuch der Physiologie*. 2. ed. 1996: Thieme Verlag. 80-90.
5. Lesli P.Gertner, J.L.H., *Color textbook of Histologie*. 2 Edidion ed. 2001 Copyright, 1997 herausgegeben. S155-159.
6. Suzuki, A., *Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers in the sheep. I. On M. semitendinosus, M. longissimus dorsi, M. psoas major, M. latissimus dorsi and gastrocnemius*. . Jap. J. Zootech.Sci., 1971a. **42**.
7. Suzuki, A., *Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers in the sheep. II. On M.serratus ventralis, M.supraspinatus, M. infraspinatus, M. semitendinosus and M. triceps brachii (Caput longum)*. Jap. J. Zootech.Sci., 1971b. **42**: p. 463-473.
8. Suzuki, A. and R.G. Cassens, *Differences in distribution of myofiber types between the supraspinatus and infraspinatus muscles of sheep*. Anat. Rec., 1995. **242**: p. 483-490.
9. Peinado, B., et al., *Histochemical skeletal muscle fibre types in the sheep*. Anat Histol Embryol, 2004. **33**(4): p. 236-43.
10. White, N.A., M.D. McGavin, and J.D. Smith, *Age-relatetd changes in percentage of fiber types and mean fiber diameters of the ovine quadriceps muscles* Am.J.Vet.Res., 1978. **39**: p. 1297-1302.
11. Moody, W.G., et al., *Effect of feeding systems, slaughter weight and sex on histological properties of lamb carcasses*. J.Anim.Sci., 1980. **50**: p. 249-256.
12. Nickel, R., A. Schummer, and E. Seiferle, *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. 6. Edition ed. 1992: Verlag Paul Parey. 438-439.
13. Kenneth J. Koval, M., *Orthopedic Knowledge Update 7*. Vol. 7. 2002: American academy of Orthopedic surgeons. 243 - 298.
14. Nakagaki, K., et al. *Alterations in the supraspinatus muscle belly with rotator cuff tearing: Evaluation with magnetic resonance imaging*. 1994.

15. Thomazeau, H., et al., *Atrophy of the supraspinatus belly. Assessment by MRI in 55 patients with rotator cuff pathology*. Acta Orthop Scand, 1996. **67**(3): p. 264-8.
16. Buirski, G., *Magnetic resonance imaging in acute and chronic rotator cuff tears*. Skeletal Radiol, 1990. **19**: p. 109-111.
17. Zanetti, M., C. Gerber, and J. Hodler, *Quantitative Assessment of the Muscles of the Rotator Cuff with Magnetic Resonance Imaging*. Investigative Radiology 1998. **33**, No.3: p. 163-170.
18. Fuchs, B., et al., *Fatty degeneration of the muscles of the rotator cuff: assessment by computed tomography versus magnetic resonance imaging*. J Shoulder Elbow Surg, 1999. **8**(6): p. 599-605.
19. Rockwood, A.C. and A.F. Matsen, *The Shoulder*. 2. Edition ed. Vol. 1. 1998. Chapter 2, Chapter 15.
20. Bjorkenheim, J., *Structure and function of the supraspinatus muscle after resection of its tendon*. Acta Orthop Scand, 1989. **60**: p. 461-3.
21. Nakagaki, K., et al., *Fatty degeneration in the supraspinatus muscle after rotator cuff tear*. J Shoulder Elbow Surg, 1996. **5**(3): p. 194-200.
22. Meyer, D.C., et al., *In vivo tendon force measurement of 2-week duration in sheep*. J Biomech, 2004. **37**(1): p. 135-40.
23. Nakagaki, K., et al., *Function of supraspinatus muscle with torn cuff evaluated by magnetic resonance imaging*. Clin Orthop Relat Res, 1995(318): p. 144-51.
24. Matsumoto, F., et al., *Delayed Tendon reattachment does not reverse atrophy and accumulation of the supraspinatus-an experimental study in rabbits*. J Orthop Res., 2002. **20**: p. 357-63.
25. Goutallier, D., et al., *Fatty muscle degeneration in cuff ruptures. Pre- and postoperative evaluation by CT scan*. Clin Orthop Relat Res, 1994(304): p. 78-83.
26. Goutallier, D., et al., *Fatty infiltration of disrupted rotator cuff muscles*. Rev Rhum Engl Ed, 1995. **62**(6): p. 415-22.
27. Gerber, C., et al., *Experimental rotator cuff repair. A preliminary study*. J Bone Joint Surg Am, 1999. **81**(9): p. 1281-90.
28. Gerber, C., B. Fuchs, and J. Hodler, *The results of repair of massive tears of the rotator cuff*. J Bone Joint Surg Am, 2000. **82**(4): p. 505-15.
29. Klaus H. Bonath, W.D.P., *Kleintierkrankheiten Band 3, Orthopädische Chirurgie und Traumatologie*. Vol. 3. 1998: Ulmer UTB. 248 - 252.
30. Slatter, *Textbook of Small Animal Surgery*. second Edition ed. 1993. 1643-1645.

31. Atesalp, A., et al., *Treatment of Type IIIa open Fractures with Ilizarov fixation and delayed primary closure in high-velocity gunshot*. Mil Med., 2002. **167**(1): p. 56-62.
32. Mantano, T., K. Tanami, and e. al., *Adaptation of Skeletal Muscle in Limb Lengthening: A Light Diffraction Study on the Sarcomere Lenth In Situ*. Journal of the Orthopaedic Research, 1994. **12**: p. 193-196.
33. Stauber, W.T., G.R. Miller, and e. al., *Adaptation of rat soleus muscles to 4 wk of intermittent strain*. Journal of Applied Physiology, 1994. **77**: p. 58-62.
34. Flück, M. and K. Hoppeler, *Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 2003(146): p. 159-216.
35. Fink, B., E. Neuen-Jakob, and e. al., *Changes in canine skeletal muscles during experimental tibial lengthening*. Clin Orthop, 2001. **385**: p. 207-18.
36. Eggenberger, M., *Histochemische und stereologische Analyse des M. levator ani (M. pubocaudalis) bei nulliparen und multiparen Beagle Hündinnen*. 2004.
37. Nunamaker, D.M., *Experimental models of fracture repair*. Clin Orthop Relat Res, 1998(355 Suppl): p. S56-65.
38. Brooke, M.H. and K.K. Kaiser, *Three "myosin adenosine triphosphatase" systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence*. J Histochem Cytochem, 1970. **18**(9): p. 670-2.
39. Brooke, M.H. and K.K. Kaiser, *Three human myosin ATPase systems and their importance in muscle pathology*. Neurology, 1970. **20**(4): p. 404-5.
40. Augsburger, H.R. and L. Cruz-Orive, *Morphological, histochemical and stereological analysis of the female canine M. urethralis*. Histochemistry, 1994. **102**: p. 373-382.
41. Rowlerson, A., *Acid myosin ATPase in mouse muscle*. J Histochem Cytochem, 1991. **39**: p. 383.
42. Brooke, M.H. and K.K. Kaiser, *Muscle fiber types: how many and what kind?* Arch Neurol, 1970. **23**(4): p. 369-79.
43. Green, H. and D. Pette, *A comparison of two ATPase based schemes for histochemical muscle fibre typing in various mammals*. Histochemistry, 1982. **76**: p. 21-31.

11 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank geht an Frau **Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg**, Leiterin der Musculoskeletal Research Unit (MSRU), für die Überlassung des Themas, sowie die hervorragende und von großem fachlichen und persönlichen Einsatz geprägte Betreuung der Arbeit. Mein Dank gilt nicht nur der Betreuung der Arbeit, sondern auch für die private und persönliche Hilfe, auf die ich immer zählen konnte.

Herrn **Prof. Dr. med. vet. Jörg A. Auer**, Direktor der Pferdeklinik der Universität Zürich, möchte ich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung der MSRU danken.

Herrn **Prof. Dr. med. Christian Gerber**, Ärztlicher Direktor und Ordinarius der Orthopädie an der Universität Zürich (Universitätsklinik Balgrist, Zürich), danke ich für das Übernehmen des Koreferates.

Herrn **Dr. med. Matthias Zumstein**, Herrn **PD Dr. med. Dominik Meyer** und Herrn **med. Eric Frey** (Mitarbeiter der Uniklinik Balgrist, Zürich) danke ich für die große Unterstützung und die sehr nette und freundschaftliche Zusammenarbeit in diesem Projekt.

Herzlichen Dank an Frau **Kati Zlinzky** und Frau **Dr. Monika Hilbe**, Institut für Veterinärpathologie, für die geduldige und hervorragende Arbeit bei der Herstellung und Auswertung der histologischen Präparate.

Vielen Dank auch an Frau **Dr. med. vet. Katja Nuss** für die Mithilfe bei den Operationen und die nette und freundschaftliche Zusammenarbeit in der MSRU.

Den **Anästhesisten** des Tierspitals Zürich möchte ich für die hervorragende Anästhesie der Schafe und das freundschaftliche Verhältnis danken.

Ebenso die möchte ich mich bei den **Tierpflegern** des Tierspitals für die immer schnelle und nette Hilfe bei den Operationen bedanken.

Meinen **Mitstreitern und Freunden aus der MSRU** danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern **Heiderose und Hans-Werner Schlemmer**, sowie an meine Geschwister **Silke und Mario Schlemmer**, mit deren Liebe, Hilfe und Unterstützung ich immer rechnen konnte.

12 Lebenslauf

Name	Inka Schlemmer
Geburtsdatum	14. März.1975
Geburtsort	Kaiserslautern
Nationalität	deutsch
Heimatort	D- 67753 Relsberg, Am Schlössert 3
1981-1985	Grundschule Wolfstein
1985-1994	St. Franziskus Gymnasium Kaiserslautern
1994-1995	Krankenpflegehilfeausbildung im Zoar Rockenhausen
1995-2001	Studium der Veterinärmedizin an der Justus Liebig-Universität in Gießen
2001-2004	Doktorandin in der Abteilung Musculoskeletal-Research Unit der Pferdeklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich unter der Leitung von Prof. Dr. Brigitte von Rechenberg
seit April 2006	Resident an der Wiederkäuerklinik der LMU München